UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE NANTES

ANNÉE 1968 - 1969 N°

Première Thèse :

Contribution à l'étude des protéines solubles du muscle adducteur de l'Huître

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté

THÈSES

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

présentées et soutenues publiquement

le 3 Juin 1969

par

Pol MORÉ

né le 25 Septembre 1927 à CHATEAULIN (Finistère)

Pharmacien

Licencié-es-Sciences

Chef de Travaux à la Faculté

MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Professeur MONNET, Président

Monsieur le Professeur PLOQUIN, Juge

Monsieur le Professeur FOUCAUD, Juge

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE NANTES

ANNÉE 1968 - 1969 N°

Première Thèse :

Contribution à l'étude des protéines solubles du muscle adducteur de l'Huître

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté

THÈSES
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

présentées et soutenues publiquement
le 3 Juin 1969
par

Pol MORÉ

né le 25 Septembre 1927 à CHATEAULIN (Finistère)
Pharmacien
Licencié-es-Sciences
Chef de Travaux à la Faculté

MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Professeur MONNET, Président
Monsieur le Professeur PLOQUIN, Juge
Monsieur le Professeur FOUCAUD, Juge

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

DE NANTES

Doyens honoraires de la Faculté :

MM. AUVIGNE, BOQUIEN

Professeurs honoraires de l'Ecole de Plein Exercice, de l'Ecole Nationale et de la Faculté :

MM. DALLONGEVILLE, GIROIRE, GUERITHAULT, GUEGUEN, LEROUX, PERRIN, PICARD

Doyen : M. J.P. KERNEIS

Assesseurs : MM. A. FOUCAUD, E. CORNET

PROFESSEURS TITULAIRES DE CHAIRE

MM.

F. BARON	O.R.L.
S. BERNARD	Biochimie médicale
Y. BOQUIEN	Clinique médicale B
R. BUREAU	Clinique chirurgicale infantile et Orthopédique
Y. BUREAU	Clinique dermatologique
A. CHARBONNEL	Neurologie
E. CORNET	Clinique chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
A. COURTIEU	Bactériologie
J. DELAIRE	Clinique stomatologique
P. DESCUNS	Clinique Neuro-chirurgicale
L. DUMORTIER	Médecine sociale et Médecine du travail
A. FOUCAUD	Botanique et Cryptogamie
J. GRISLAIN	Clinique médicale infantile
R. GUIHARD	Physique
J. GUILLON	Pathologie médicale
J. HOREAU	Clinique Médicale A
P. HOULNE	Clinique obstétricale
J.P. KERNEIS	Anatomie pathologique
J. LEGRAND	Clinique ophtalmologique
E.P. LOSSOUARN	Chimie pharmaceutique
P. MALVY	Pathologie chirurgicale
R. MONNET	Matière médicale et Pharmacologie
M. MOUSSEAU	Clinique chirurgicale
M. NEDELEC	Clinique urologique
J. PLOQUIN	Pharmacie chimique
M. ROUZET	Pharmacie galénique
J. SOURDILLE	Clinique traumatologique
Y. STEPHAN	Pharmacodynamie et Chimie Biologique Pharmaceutique
J. TUSQUES	Histologie et Embryologie
P. VERAN	Thérapeutique
C. VERMEIL	Parasitologie et Pathologie exotique
P. VIOLETTE	Physiologie

PROFESSEURS TITULAIRES A TITRE PERSONNEL

MM.

F. GILLOT	Pédiatrie
P. MINICONI	Médecine générale
Mme MUSSINI-MONTPELLIER	Anatomie Pathologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.

J. BARBIN	Anatomie
H. BARRIERE	Dermatologie
H. BOITEAU	Toxicologie
S. COTTIN	Médecine générale et Thérapeutique
J. GUENEL	Médecine générale
J. GOUIN	Orthopédie
D. GUIHARD	Physique
F. HERVOUET	Ophtalmologie
E. PICHAT	Anatomie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM.

P. ARNAUD (f.f.)	Physique
J.V. BAINVEL (f.f.)	Traumatologie
L. BODIC (f.f.)	Médecine générale
M. COLLET	Neuro-Chirurgie
J. CORROLLER	Pneumo-Phtisiologie
H. DUPON	Chirurgie thoracique et Cardiovasculaire
A. GAILLARD	Stomatologie
P. GALLE	Physique Biologique
J.D. GINET	Physiologie
D. HERVOUET	Médecine générale
Mme A.M. HERZOG (f.f.)	Electroradiologie
B. HERZOG	Electroradiologie
G. LEFRANC (f.f.)	Histologie et Embryologie
F. LEGENT (f.f.)	O.R.L.
M. LERAT	Obstétrique
Y. MADEC (f.f.)	Biochimie médicale
R. MAINARD	Clinique médicale infantile
Ch. MOIGNETEAU	Pneumo-Phtisiologie
Mme F. NICOLAS	Anesthésiologie
G. NICOLAS	Médecine légale
P. OUDEA	Médecine générale et Thérapeutique
Mme Y. DE ROECK	Pharmacie galénique
Ch. ROUSSEAU (f.f.)	Sciences Naturelles
J. TARDIVEAU	Electroradiologie
P. VERCELLETTO (f.f.)	Neurologie
L. WELIN	Pharmacodynamie

PROFESSEURS HONORAIRES A TITRE PERSONNEL

1ère.

F. GILLOT	Psychiatrie
P. MINIGONI	Médecine générale
Mme MUSSINI-MONTPELLIER	Anatomie Pathologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

1ère.

J. BABIN	Urologie
H. BARRIERE	Anesthésiologie
H. BOTTEAU	Pneumologie
S. COTTIN	Médecine préventive et Thérapeutique
J. GUERIN	Médecine générale
J. GOUIN	Orthopédie
D. GUTMANN	Pédiatrie
T. MERVOUET	Gynécologie
E. PICHAT	Urologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

1ère.

Z. ARMAND (C.T.)	Urologie
J.M. BAINVEL (C.T.)	Pneumologie
L. BOGIO (C.T.)	Médecine générale
M. COLLET	Ophtalmologie
J. CORDELLE	Pneumo-Phtisiologie
H. DUPOY	Pharmacie Galénique et Pharmacodynamie
A. DATILANO	Dermatologie
P. DAUZE	Chir. des Hôpitaux
J.D. GIRET	Pneumologie
D. MERVOUET	Médecine générale
Mme A.M. MERMIN (C.T.)	Thérapeutique
R. BURGUN	Hématologie
G. LAFRAND (C.T.)	Biochimie et Endocrinologie
J. LEFRET (C.T.)	O.R.L.
M. LEPAC	Chirurgie
Y. MARC (C.T.)	Médecine préventive
R. MAIRAND	Clinique médicale internationale
Ch. MOLINETTI	Pneumo-Phtisiologie
Mme F. MIGEAT	Gynécologie
G. MICHAS	Médecine légale
P. GUIZA	Médecine générale et Thérapeutique
Mme Y. DE FOEST	Physiologie cardiaque
Ch. ROUSSEAU (C.T.)	Médecine Interne
J. VAUGIRAUD	Thérapeutique
P. VIGOUROUX (C.T.)	Hématologie
R. MELIN	Pharmacodynamie

AGREGES EN EXERCICE

MM.

J. AUVIGNE	Urologie
A. SILVESTRE DE FERRON	Chirurgie générale

Secrétaire de la Faculté	M. E. BOULESTEIX
Conservateur de la Bibliothèque de l'Université	Mme GALKOWSKI

En souvenir de mes Parents et de mon Beau-Père

Ils furent et restent toujours
pour moi un exemple.

A ma femme

Je lui dois beaucoup. Elle fut ma collaboratrice
tout au long de ce travail.

A ma fille, Frédérique

A mes soeurs, à mes beaux-frères, à mes neveux et nièces

A ma belle-mère

A ma famille

A mes camarades

A mes amis

En témoignage de ma profonde affection

A Monsieur le Professeur M. FONTAINE

Membre de l'Institut

Directeur du Museum National d'Histoire Naturelle

Professeur de Physiologie générale et comparée

Directeur de l'Institut Océanographique

qui nous a aimablement reçu dans son Laboratoire et qui a bien voulu nous donner des directives pour ce travail.

Qu'il soit assuré de notre profonde gratitude et de notre respectueux dévouement.

Nous remercions son équipe de recherche et en particulier son fils Y.A. FONTAINE pour les conseils qu'ils nous ont prodigués.

A Monsieur le Professeur J.P. KERNEIS

Doyen de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de NANTES

Professeur d'Anatomie pathologique

Hommage de notre

respectueux dévouement.

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur R. MONNET

Professeur de Matière médicale et Pharmacologie

Biologiste Chef de Service au Centre Hospitalier Universitaire

Il nous a toujours guidé sur le chemin de notre carrière universitaire, nous a encouragé dans les moments difficiles, nous redonnant confiance par son calme et ses conseils.

Ses directives au cours de l'élaboration de ce travail nous furent particulièrement précieuses.

Nous lui demandons de vouloir bien accepter l'hommage de notre profonde reconnaissance et nous l'assurons de notre respectueux dévouement et de notre fidèle attachement.

A Monsieur le Professeur J. PLOQUIN

Professeur de Pharmacie chimique

Il fut pour nous un maître particulièrement apprécié. Son attachement à la recherche scientifique qui apparaissait dans son enseignement, fut un des facteurs de notre orientation actuelle.

Nous avons été sensible à la sympathie qu'il nous a toujours prodiguée. Nous le remercions de l'honneur qu'il nous fait en jugeant notre thèse.

Qu'il soit assuré de nos sentiments de gratitude et de notre respect.

A Monsieur le Professeur A. FOUCAUD

Premier Assesseur du Doyen

Professeur de Botanique et de Cryptogamie

Il fut notre Professeur de Botanique, de Cryptogamie et de Physiologie végétale.

Il nous a toujours témoigné une grande bienveillance et beaucoup de sympathie.

Nous le remercions d'avoir accepté de faire partie de notre jury, et nous lui exprimons ici notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur C. ROUSSEAU

Chargé des Fonctions de Maître de Conférences-agrégé
de Zoologie et de Biologie animale.

dont l'enseignement nous a fait aimer la Biologie

Qu'il soit remercié de la sollicitude qu'il nous
a témoignée dans le Service de Zoologie et de
Biologie animale de la Faculté et qu'il soit
assuré de nos sentiments dévoués.

A Madame POISBEAU

Chef de Travaux de Micrographie et Parasitologie

Chargé de cours de Physiologie

qui nous a manifesté une constante sympathie

Son enthousiasme et son dynamisme nous ont toujours soutenu dans les moments difficiles.

Ses qualités de Zoologiste chevronnée et de Physiologiste nous ont été précieuses.

Qu'elle trouve ici l'expression de notre affection, de notre attachement et l'assurance de notre dévouement.

A tous nos Professeurs de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de NANTES

dont l'enseignement nous a été particulièrement précieux.

A tous nos Professeurs de la Faculté des Sciences de RENNES et de la Faculté des Sciences de NANTES

qui nous ont initié à des disciplines d'un grand intérêt pour nos recherches.

A tous nos collègues, Chef de Travaux, Assistants ou collaborateurs de la Faculté, en particulier à Monsieur CHENEAU, Monsieur FAUCHER, Madame FRELAND et Monsieur J.R. POISBEAU

qui nous ont aidé et conseillé.

En témoignage de profonde amitié

A notre beau-frère, Monsieur M. HARDOUIN

qui nous a orienté vers les études de Pharmacie et fut notre maître de stage.

En témoignage de notre affection.

A tous ceux qui furent nos éducateurs au collège et à l'Ecole Spéciale Militaire Inter-Armes

et qui surent nous donner le goût de l'étude et le sens du travail.

A Monsieur F. TAUNAY

dont les qualités, la collaboration technique consciencieuse et efficace ainsi que le dévouement constant nous ont été particulièrement précieux dans la réalisation de ce travail.

A Monsieur J.F. BIARD

Préparateur du cours

dont nous avons pu apprécier la gentillesse et l'efficacité

A Madame AMESLANT

dont l'initiative et la clarté d'esprit ont contribué pour beaucoup à la présentation de cette thèse.

A Monsieur VIOLANTE et à son équipe

qui, avec beaucoup de gentillesse et de diligence, ont réalisé, dans des conditions difficiles, l'impression de cette thèse.

Qu'ils soient tous remerciés.

A Monsieur E. BOULESTEIX

Conseiller administratif

Secrétaire général de la Faculté

A Madame BURLOT

Attaché principal

pour l'aide administrative qu'ils nous ont toujours apportée dans le déroulement de notre carrière universitaire.

A Madame GALKOWSKI

Conservateur de la Bibliothèque de l'Université

A Mademoiselle HUBERT

A Madame PARENTHOINE

dont l'aide et la serviabilité nous ont été si utiles au cours de nos recherches bibliographiques.

Avec nos sincères remerciements.

Nous remercions le Docteur BRUNEAU

Directeur du Laboratoire de Photologie de la Faculté

qui a contribué à la documentation photographique du Laboratoire.

Nous remercions l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes

et plus particulièrement le Docteur ROGER et le Docteur BORDE

qui nous ont aidé à constituer notre documentation sur l'Ostréiculture.

Nous remercions les Ostréiculteurs du Croisic, de Riec-sur-Bélon et

de la Tremblade

qui nous ont familiarisé aux problèmes de l'Ostréiculture et nous ont fourni des huîtres pour notre expérimentation.

Nous remercions les Laboratoires pharmaceutiques CHOAY, DEBAT et DIAMANT qui nous ont aimablement fourni des protéines de référence.

Nous adressons nos sincères remerciements à la Société OLIVETTI, qui a mis gracieusement à notre disposition un calculateur électronique "Programma 101" pour la réalisation de notre travail.

Par délibération en date du 7 mars 1962, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

INTRODUCTION

L'huître est l'un des rares animaux marins qui fait l'objet, depuis déjà fort longtemps, d'un élevage intensif et organisé dans de nombreux pays. Son importance économique est indiscutable pour l'Ouest de la France, et notamment pour la Bretagne. Son intérêt nutritif et même thérapeutique a été souligné par divers auteurs.

Le développement de l'Ostréiculture a suscité des travaux de biologie, de physiologie et de biochimie sur les diverses espèces d'huîtres.

Monsieur le Professeur MONNET, à la suite d'un entretien avec Monsieur le Professeur QUEVAUVILLER, nous avait demandé, il y a quelques années, d'examiner les possibilités d'utilisation des huîtres ou de certains de leurs organes comme animaux ou réactifs de laboratoire dans l'expérimentation de médicaments agissant sur le système nerveux végétatif, sur le système nerveux central et surtout sur les muscles striés et lisses.

Chez les Mollusques Bivalves, les muscles adducteurs ont une physiologie particulière. Ces animaux sont en effet les seuls à pouvoir maintenir leurs valves fermées pendant une période prolongée, sans dépense appréciable d'énergie, grâce à un mécanisme étudié sous le nom de "catch mechanism" par des auteurs qui ont émis à son sujet des hypothèses séduisantes. Des deux parties formant ces muscles, partie transparente et partie nacrée, la dernière surtout interviendrait dans ce mécanisme.

Les protéines de structure de ces muscles ont été étudiées par de nombreux auteurs. Par contre, sur les protéines sarcoplasmiques, encore appelées "protéines solubles", les recherches ont été rares.

La connaissance des protéines solubles des muscles adducteurs de l'huître nous a paru importante, car elles représentent une grande part de leur "enveloppe" métabolique et énergétique. De plus, elles peuvent être une source de renseignements pour essayer de fixer une taxonomie biochimique des Ostreidae.

Avant d'aborder l'étude de ces protéines solubles, nous avons consulté Monsieur le Professeur Maurice FONTAINE, Directeur du Muséum d'Histoire Naturelle, spécialiste de la physiologie neuro-endocrinienne des poissons, pour connaître les techniques utilisées dans son Laboratoire. Il nous a accueilli très aimablement et nous a suggéré diverses orientations pour notre travail. Nous tenons à le remercier bien vivement de tous les conseils qu'il a bien voulu nous donner dans l'élaboration de cette thèse.

Ayant réuni la documentation sur certaines techniques d'étude des protéines, grâce aux références obligeamment communiquées par Monsieur Y.A. FONTAINE, nous avons particulièrement étudié la chromatographie d'exclusion-diffusion, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide et l'électrophorèse sur acétate de cellulose.

Ces méthodes ont dû être adaptées à nos problèmes particuliers pour l'extraction et le fractionnement des protéines solubles du muscle adducteur des trois espèces d'huîtres que nous avons étudiées :

<u>Crassostrea angulata</u> Lmk ou huître portugaise

<u>Crassostrea gigas</u> Thunberg ou huître japonaise

<u>Ostrea edulis</u> L. ou huître plate européenne.

Après avoir rappelé la classification des Ostreidae, l'anatomie des huîtres, la structure et la physiologie de leur muscle adducteur, nous serons amenés à discuter des méthodes d'étude des protéines solubles de ce muscle, préalablement à la présentation et à un essai d'interprétation des résultats.

Le plan de notre thèse peut être ainsi schématisé :

Première partie - TAXONOMIE DES OSTREIDAE

- Taxonomie classique
- Taxonomie biochimique

Deuxième partie - LE MUSCLE ADDUCTEUR DES OSTREIDAE

- Aspect phylogénétique
- Aspect ontogénétique
- Le muscle adducteur de l'huître adulte

Troisième partie - METHODES D'EXTRACTION DES PROTEINES

- Les grandes fractions protéiques musculaires
- Les problèmes posés par l'extraction
- Analyse des principaux travaux
- Les méthodes d'extraction choisies

Quatrième partie - METHODES DE FRACTIONNEMENT DES PROTEINES

- Chromatographie d'exclusion-diffusion
- Electrophorèse sur acétate de cellulose gélatineux
- Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Cinquième partie - APPLICATIONS DES TECHNIQUES A L'ETUDE DES PROTEINES DU MUSCLE ADDUCTEUR D'OSTREIDAE

- Détermination de la teneur en protéines
- Application de la chromatographie d'exclusion-diffusion
- Application de l'électrophorèse en acétate de cellulose et gel de polyacrylamide
- Essai combiné des méthodes

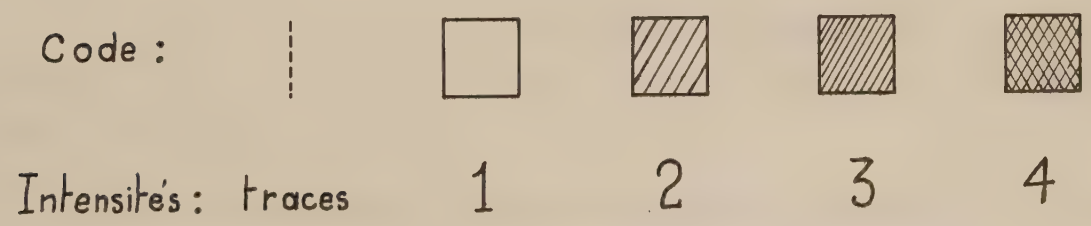
Sixième partie - ESSAIS D'INTERPRETATION BIOLOGIQUE DES RESULTATS

- Comparaison des protéines du muscle adducteur de l'huître et des muscles squelettiques de la carpe
- Taxonomie biochimique

Abréviations employées dans la thèse

Bis	:	N, N'-méthylènebisacrylamide
C. a	:	*Crassostrea angulata*
C. g	:	*Crassostrea gigas*
E.D.T.A.		acide ethylènediaminotétraacétique
F.P.M.	:	faibles poids moléculaires
M.B.	:	muscle blanc
M.C.	:	muscle complet
O. e	:	*Ostrea edulis*
P.M.	:	poids moléculaire
P.N.	:	partie nacrée
P.T.	:	partie transparente
Temed	:	N, N, N', N'-tétramethyléthylènediamine
Tris	:	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
$\frac{\Gamma}{2}$	:	force ionique

Code permettant l'estimation des intensités de coloration des fractions protéiques.



" Though beloved by gourmets from the earliest time, oysters have never been a delight to systematic conchologists ".

IREDALE (106)

PREMIERE PARTIE

TAXONOMIE DES OSTREIDAE

Pour certains auteurs, Taxonomie et Systématique sont des termes synonymes, pour d'autres, ils ont des significations quelque peu différentes. Ainsi, SOKAL (233) distingue :

- la Systématique ou étude générale de la nature organisée, comprenant l'explication causale et historique des phénomènes observés,

- de la Taxonomie, subdivision de la systématique qui s'occupe uniquement de la description, de la classification et de la nomenclature de la nature organisée considérée comme telle.

Les critères de classification des organismes ont été d'abord morphologiques, anatomiques, écologiques et géographiques; ensuite ont été invoqués des critères physiologiques et génétiques; enfin depuis quelques années, s'ajoutent des critères biochimiques.

FERRIS (53) écrivait, en 1928, que la taxonomie doit classer les organismes "par tous les moyens dont on peut se servir pour arriver à la connaissance des faits biologiques, que ces moyens soient d'ordre morphologique, anatomique, physiologique, expérimental, génétique ou même chimique" et FLORKIN (55) ajoute : "et évidemment aussi d'ordre phylogénétique" (*).

La notion de biochimie appliquée à la taxonomie n'est pas nouvelle puisque, dès 1854, ROCHLEDER en montrait l'importance botanique.

Mais, ce n'est que depuis quelques années que l'on voit paraître un nombre important de travaux sur ce sujet. Ceci est dû aux grands progrès de la chimie et de la biochimie d'une part, et d'autre part, aux énormes possibilités d'investigation qu'offre aux biochimistes le monde animal ou le monde végétal. Zoologistes, botanistes et biochimistes ont été amenés à travailler ensemble et ainsi à mieux connaître des problèmes d'intérêt commun. Outre la formation d'Equipes, de nombreux chercheurs sont devenus "pluridisciplinaires". Il suffit de dénombrer les zoologistes, qui sans rien négliger des fondements même de la zoologie classique, qui reste leur discipline de base, se livrent à des travaux de biochimie et de biophysique.

Il est maintenant admis que la morphologie de la nature organisée n'est que l'expression de certains caractères physico-chimiques qui, de ce fait, prennent toute leur importance du point de vue taxonomique. L'expérience a souvent confirmé cette importance. Il est certes hors de question de construire une classification basée uniquement sur des critères biochimiques. La taxonomie classique garde toute sa valeur et reste le cadre auquel

---

(*) La Phylogénie peut toujours être définie l"histoire de l'espèce ou la succession des étapes ou des états successifs par lesquels ont passé au cours des temps les lignées animales ou végétales" (103).

doit se soumettre le biochimiste pour ne pas s'égarer lors de travaux de biochimie comparée et de phylogénèse. Inversement, il ajoutera des faits nouveaux d'ordre biochimique à ceux déjà énoncés par la taxonomie classique.

" Une bonne classification doit être commode et doit avoir une valeur "prédictive" maximum " (147).

De ce fait, le choix des caractères taxonomiques est une opération importante et délicate. MAYR (147) énonce ainsi les bases sur lesquelles le taxonomiste doit appuyer sa décision :

" 1 - Il donne une faible valeur à tout caractère qui varie beaucoup à l'intérieur de groupes d'espèces ayant des affinités entre elles et qui montre une variation semblable dans d'autres groupes qui ne possèdent que de vagues relations entre eux.

2 - Il donne une faible valeur aux caractères qui font partie d'un complexe fonctionnel qui, dans son ensemble, a déjà été inclus dans l'évaluation de l'affinité.

3 - Il assigne une valeur élevée aux caractères qui sont à l'opposé de 1 et 2. De ce fait, il donne une valeur élevée aux caractères qui sont plutôt constamment présents dans un groupe donné et plutôt constamment absents des autres groupes.

4 - Il donne une valeur élevée aux caractères qui sont fonctionnellement indépendants les uns des autres.

5 - Il donne une valeur élevée aux caractères qui ne sont pas aisément affectés par des modifications écologiques. "

TAXONOMIE CLASSIQUE

Les Zoologistes classent les Ostréidae dans l'Embranchement des Mollusques, classe des Bivalves.

Cet embranchement comprend 7 classes :

- la classe des Aplacophores
- la classe des Polyplacophores
- la classe des Monoplacophores
- la classe des Bivalves
- la classe des Scaphopodes
- la classe des Gastéropodes
- la classe des Céphalopodes

Les caractères généraux des Bivalves, encore appelés Acéphales, Lamellibranches, Pélécypodes peuvent être résumés ainsi :

Mollusques aquatiques à symétrie bilatérale, en général, à corps protégé par deux valves presque toujours externes reliées dorsalement par un ligament élastique qui tend à les écarter et souvent engrenées par des dents constituant une charnière. Fermeture des valves assurée par deux muscles adducteurs qui les relient l'une à l'autre et dont l'antérieur peut s'atrophier ou disparaître.

Deux lobes palléaux enveloppant le corps plus ou moins comprimé latéralement, secrètent la coquille.

Pied souvent aplati, en carène, en fer de hache, linguiforme, parfois atrophié ou absent, pourvu ou non d'une glande byssogène.

Tête rudimentaire, sans radula. Animaux filtrants à ciliation complexe, utilisant des palpes labiaux et des cténidies très développées.

Tube digestif comprenant un estomac à stylet cristallin en général et un rectum qui traverse ou non le ventricule du coeur.

Coeur enclos dans un péricarde avec un ventricule et deux oreillettes; sang le plus souvent incolore.

Système nerveux essentiellement constitué par trois paires de ganglions; mais réductions possibles.

Reins pairs en communication avec le péricarde et l'extérieur.

Appareil génital à gonoductes s'ouvrant à l'extérieur ou dans les reins. Sexes séparés ou réunis; fécondation à l'extérieur des voies génitales. Larves nageuses libres ou incubées dans les branchies ou la cavité palléale.

Organes sensoriels divers.

Vit en mer, en eau douce ou en eau saumâtre; espèces fixées ou libres, souvent fouisseuses et parfois perforantes.

Répartition universelle.

Les branchies ont été choisies comme critère de classification des Bivalves. On distingue (61) quatre ordres :

- ordre des Protobranchia,
- ordre des Filibranchia,
- ordre des Eulamellibranchia,
- ordre des Septibranchia.

Certains auteurs distinguent seulement (163) trois sous classes : Protobranchia, Lamellibranchia, Septibranchia; les Lamellibranchia possédant, soit le caractère filibranche, soit le caractère eulamellibranche.

Les Protobranchia ont des branchies à filaments simples, non réfléchis. Les Septibranchia possèdent une branchie modifiée en un septum musculaire percé de pores. Quant aux Filibranchia et aux Eulamellibranchia, ils possèdent des branchies à filaments réfléchis comportant des jonctions

interfilamentaires. Ces jonctions sont ciliaires ou ciliaires et tissulaires chez les premiers, tissulaires et squelettales chez les seconds.

Les Filibranchia se subdivisent en deux Sous-Ordres :

- sous-ordre des Taxodonta,
- sous-ordre des Anisomyaria.

Le critère de la charnière caractérise le premier sous-ordre. L'inégalité des muscles adducteurs définit le second, dont les caractères généraux sont :

Branchies avec généralement des jonctions interlamellaires de type vasculaire. Fixation par byssus amenant une diminution du muscle adducteur antérieur, donnant naissance éventuellement au caractère monomyaire avec réarrangement complet de la symétrie amenant parfois la cémentation (p.ex. Ostreidae), parfois l'état libre (p.ex. de nombreux Pectinidae). Manteau ouvert (à l'exception de la séparation du pore exhalant); pied petit (parfois absent), pas de siphon. Dents véritables souvent absentes ou parfois remplacées par de petits denticules. Prodissoconques à charnière crénelée.

Le sous-ordre des Anisomyaria se divise en plusieurs superfamilles dont la superfamille des Ostreoidea, qui coiffe la famille des Ostreidae.

La famille des Ostreidae (Huîtres) groupe des espèces dites monomyaires, car le muscle adducteur antérieur est absent chez l'adulte. Elle présente les éléments essentiels suivants : Pied atrophié. Pas de dents à la charnière, constituée d'un seul ligament triangulaire. Coquille inéquivalve. Branchies plus complexes que chez les autres anisomyaires. Pas de byssus; coquille fixée au substrat, directement par la valve gauche, souvent déformée selon le support.

IDENTIFICATION DES GENRES

On a pu écrire avec raison que les Huîtres étaient "un groupe infernal". La grande variabilité des caractères de la coquille adulte ne permet pas en effet leur identification. Cependant, ces caractères ne doivent pas être négligés. Ils permettent, en s'aidant des caractères anatomiques, des caractères sexuels, de notions écologiques et des caractères de la coquille larvaire (appelée prodissoconque) de définir, chez les Ostreidae, trois genres :

- Le genre Pycnodonta Fischer de Waldheim 1885, dont le génotype est Pycnodonta radiata Fischer de Waldheim,

- Le genre Ostrea Linné, 1758, dont le génotype est Ostrea edulis Linné,

- Le genre Crassostrea Sacco, 1897, dont le génotype est Crassostrea virginica Gmelin.

Genre Pycnodonta

Larve :
Prodissoconque équivalve à provinculum muni de 5 crénelures réparties sur toute sa longueur; ligament interne, antérieur, immédiatement après le provinculum. Antérieurement au ligament, se trouvent dix petites crénelures sur le bord de chaque valve.

Adulte :
Présence d'une chambre promyaire; le ventricule du coeur entoure le rectum. La femelle rejette ses oeufs, non fécondés, dans la mer (non incubatrice).

Chambres crayeuses à structure vacuolaire. Denticules en forme de rides vermiculées aux deux valves, de chaque côté de la charnière.

Coquilles grandes et solides; valve inférieure avec une légère cavité sous la charnière; sans sculptures à l'exception de crénulations ai-

guës aux extrémités; charnière très large. Intérieur des valves blanc ou verdâtre; impression musculaire blanche sur une petite protubérance. Gonades orangé vif.

Genre Crassostrea

Larve :
Prodissoconque inéquivalve à provinculum muni de deux crênelures à chacune de ses extrémités; ligament interne antérieur, hors du provinculum.

Adulte :
Présence d'une chambre promyaire; le ventricule du coeur n'est pas enroulé autour du rectum. La femelle rejette ses oeufs non fécondés, dans la mer (non incubatrice).

Chambres crayeuses à structure feuilletée. Trois espèces seulement ont des denticules de chaque côté de la charnière, sur le bord interne de la valve supérieure; trous correspondants à la valve inférieure.

Coquille très variable, le plus souvent allongée; valve inférieure en forme de coupe profonde avec une cavité sous la charnière; valve supérieure plate, operculaire; impression musculaire, déplacée dans une direction dorso-latérale, normalement très pigmentée. Ostia des branchies relativement petits.

Genre Ostrea

Larve :
Prodissoconque à provinculum muni de deux crênelures à chacune de ses extrémités; crênelures antérieures souvent très réduites; ligament interne, au niveau du provinculum, au centre ou entre le centre et l'extrémité antérieure.

Adulte :
Pas de chambre promyaire; le ventricule du coeur n'est pas enroulé autour

du rectum. La femelle conserve ses larves pendant quelques jours entre ses valves, puis les rejette dans la mer (incubatrice).

Chambres crayeuses à structure feuilletée. Denticules de chaque côté de la charnière, sur le bord interne des deux valves ou de la valve supérieure avec trous correspondants à la valve inférieure.

Coquille subcirculaire; valve inférieure peu profonde, sans cavité sous la charnière; valve supérieure plate, operculaire, parfois en forme de dôme; impression musculaire subcentrale, non colorée. Ostia des branchies relativement grands.

La classification des genres paraît assez bien établie à l'heure actuelle. Mais, il n'en a pas toujours été ainsi.

Nous avons présenté les trois genres en faisant une synthèse des définitions données par RANSON (206), GALTSOFF (63) et YONGE (276).

Nous avons énoncé en premier lieu les caractères les plus importants, laissant pour la fin de chaque paragraphe des caractères plus contestés. RANSON (199) n'admet pas la présence ou l'absence de cavité sous la charnière comme critère de classification. En effet, si O. edulis ne possède jamais de cavité sous le plateau, C. angulata a ou n'a pas (masse calcaire) de cavité sous le plateau suivant les conditions dans lesquelles croît l'animal. Nous avons opéré des coupes longitudinales de coquilles d'O. edulis et de C. angulata pour illustrer cette différence qui, quoique incertaine, est cependant assez commune. (figure 1).

Un autre caractère incertain est celui des denticules marginaux de la coquille adulte. D'après RANSON (200), si ceux-ci sont généralement présents chez Pycnodonta, leur présence chez Ostrea n'est pas constante, car des échantillons en sont dépourvus. Ils sont absents chez Gryphaea (actuellement Crassostrea) sauf dans trois espèces : cucullata, denticulata, margaritacaea. Mais, il arrive qu'ils manquent totalement, tout particulièrement chez margaritacaea. Nous avons dessiné (figure 2) les denticules

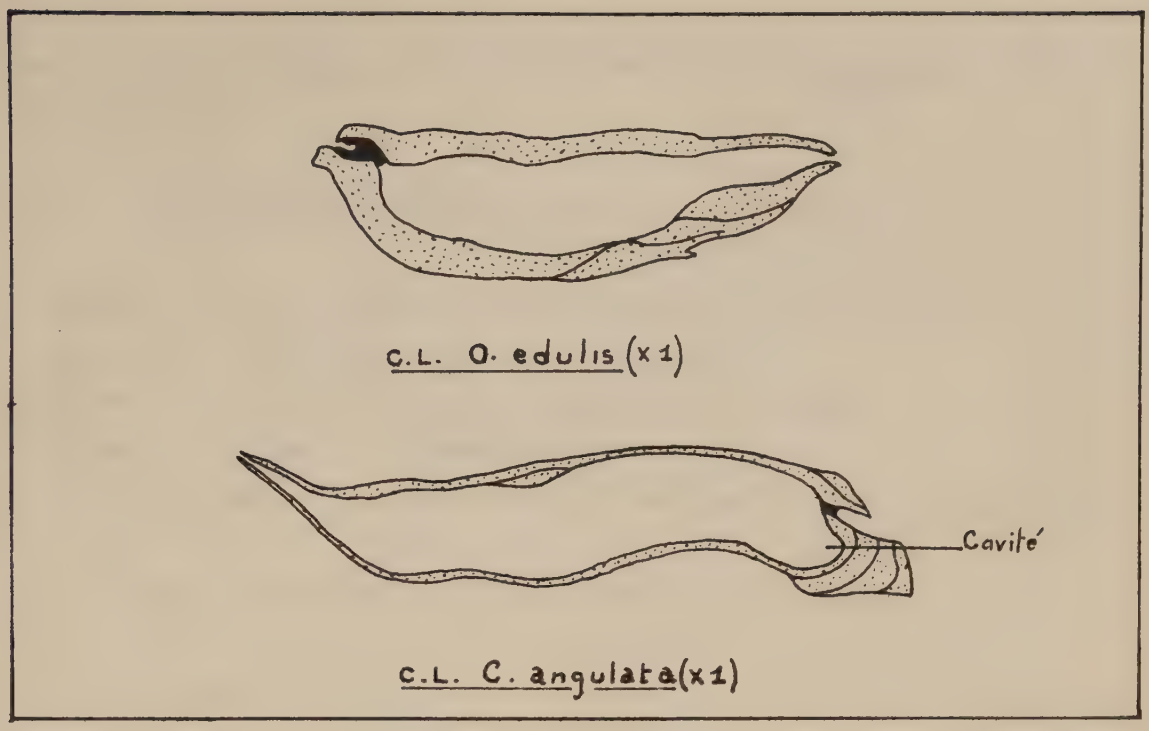


Figure 1.- Coupes longitudinales de coquilles, illustrant la présence d'une cavité sous la charnière chez C. angulata.

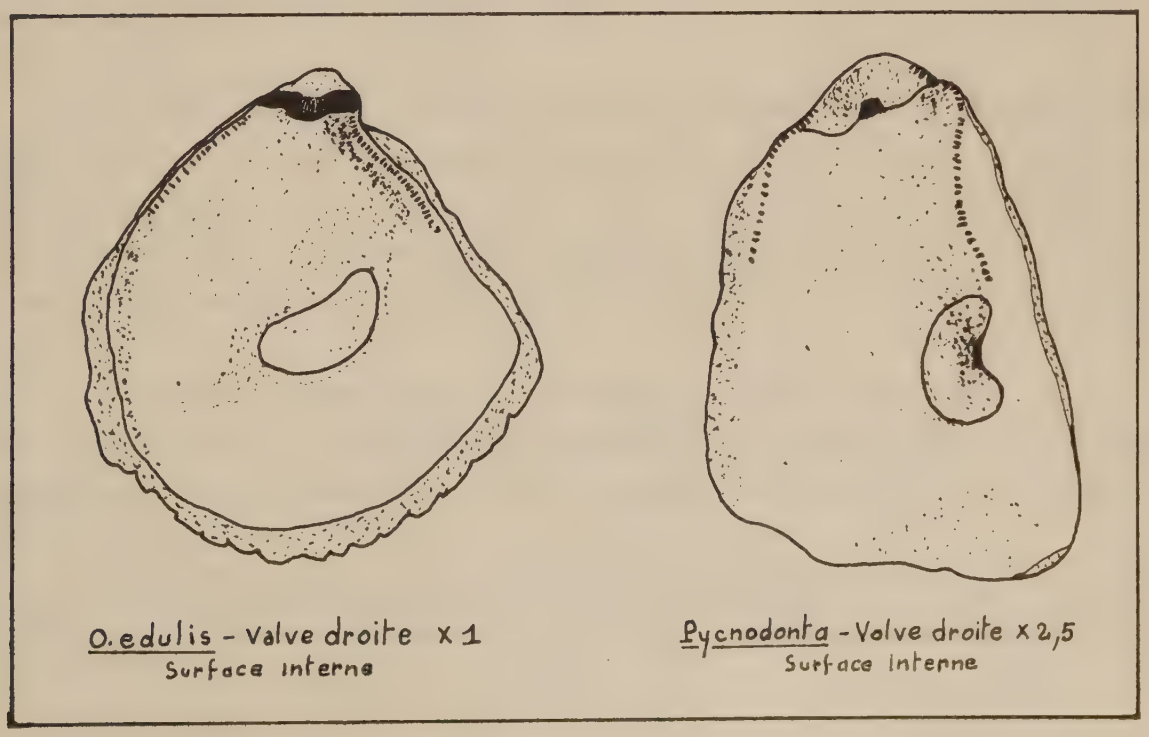


Figure 2.- Denticules marginaux chez O. edulis et Pycnodonta.

observés chez O. edulis, et sur un échantillon de Pycnodonta sp(draguée au large d'Ouessant).

Les caractères suivants sont de grande valeur :

- position du ventricule par rapport au rectum,
- caractère d'incubation ou de non incubation,
- aspect feuilleté ou vacuolaire des chambres crayeuses,
- présence ou absence de chambre promyaire,
- caractères du provinculum de la prodissoconque (coquille larvaire).

Nous insisterons sur ces deux derniers caractères.

Chambre promyaire

La découverte de la chambre promyaire chez certaines espèces d'huîtres faite par NELSON (170) en 1938 a été très tardive, certainement à cause de l' "intérêt disproportionné pour les coquilles des Mollusques par rapport aux parties molles".

Chez certaines espèces d'huîtres, le lobe droit du manteau n'est fusionné avec la masse viscérale que sur un très court espace, près du capuchon céphalique. Entre cette zone et le muscle adducteur, le lobe droit du manteau est libre, formant une chambre promyaire qui fait communiquer la chambre épibranchiale droite avec l'extérieur. C'est le cas de C. angulata.

Chez d'autres espèces, la chambre promyaire est absente : le lobe droit du manteau est complètement fusionné, de la même manière que le lobe gauche avec le péricarde et la masse viscérale. C'est le cas d'O. edulis.

Nous avons représenté (figure 3) deux espèces d'huîtres où nous avons mis en évidence la présence ou l'absence de cette chambre promyaire.

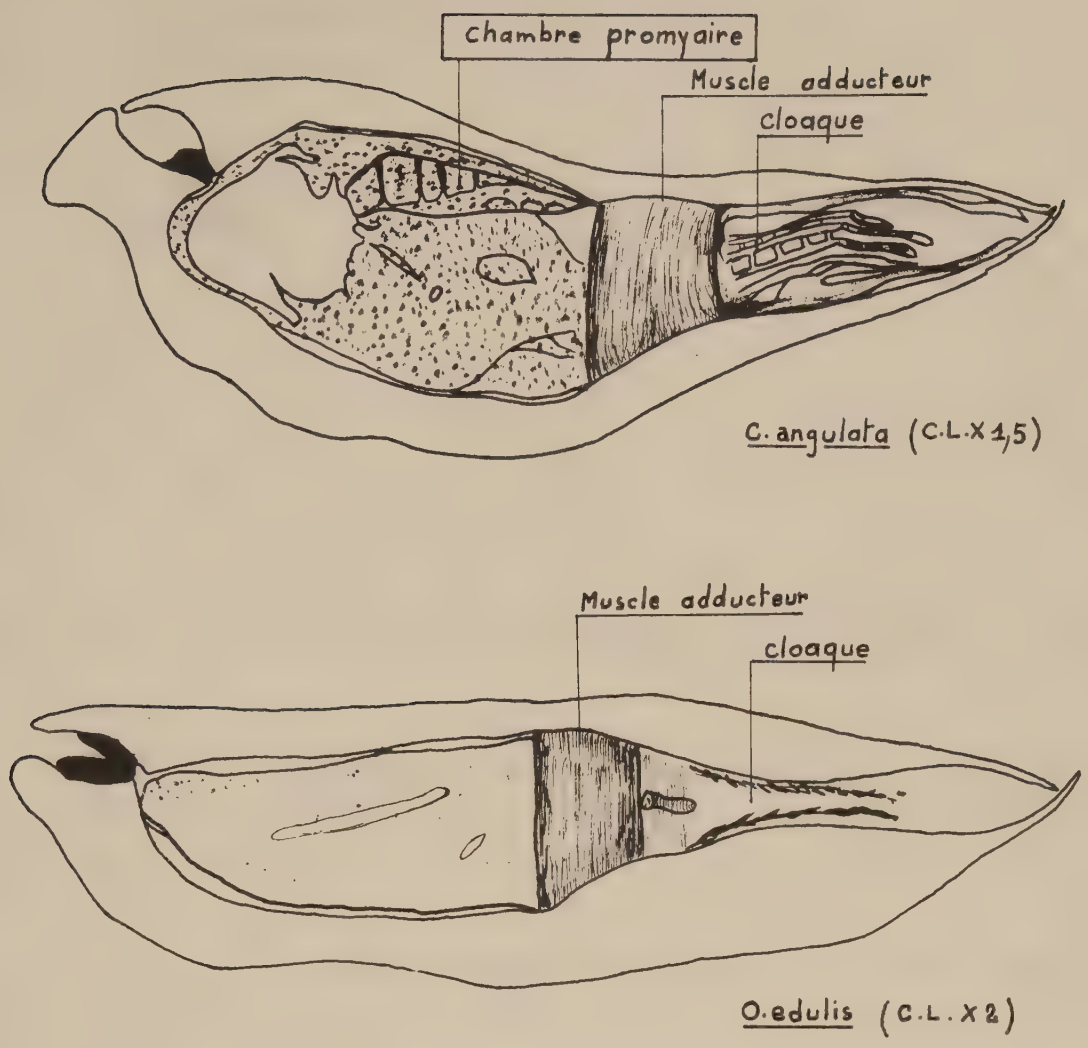


Figure 3.- Coupes longitudinales d'huîtres, illustrant la présence d'une chambre promyaire chez C. angulata.

Provinculum de la prodissoconque

Dans une série de publications s'étendant de 1939 à 1967, RANSON (198)(199)(200)(205)(206) s'est livré à une étude fort précise de la prodissoconque des Huîtres. Il a démontré l'intérêt considérable des caractères de la prodissoconque comme critères de classification des Ostreidae. Le provinculum permet de différencier les genres, et la forme générale de la prodissoconque permet de caractériser les espèces.

Voici,empruntés à RANSON, les prodissoconques des génotypes des différents genres (figure 4) :

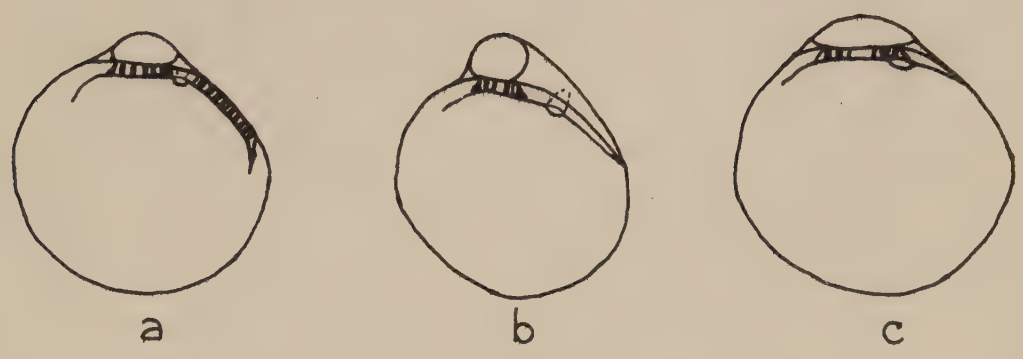


Figure 4.- Prodissoconques de : a, Pycnodonta; b, Crassostrea; c, Ostrea.

Le genre Pycnodonta possède une prodissoconque dont le provinculum possède cinq crénelures réparties sur toute la longueur et dix petites crénelures antérieures (203).

Les genres Ostrea et Crassostrea possèdent deux crénelures à chaque extrémité de leur provinculum, mais la position du ligament varie d'un genre à l'autre (203).

En nous appuyant sur les caractères principaux, nous pouvons dresser le Tableau I résumant les éléments de classification des trois genres.

IDENTIFICATION DES ESPECES

Identifier une espèce d'huître par l'étude de sa coquille adulte est extrêmement aléatoire. En effet, celle-ci subit de nombreuses déformations amenant un polymorphisme empêchant toute classification sérieuse.

La forme générale de la prodissoconque définitive, constante pour une espèce donnée, même lorsque la taille varie, doit permettre, selon

TABLEAU I

Eléments de classification des trois genres.

Reproduction	Chambre promyaire	Intestin traverse coeur	Chambres crayeuses	Provinculum de la prodissoconque		Genre
non incubatrice	+	oui	vacuolaires	5 crénelures + 10 antérieures		PYCNODONTA
		non	feuilletées	2 crénelures à chaque extrémité	Ligament hors du provinculum	CRASSOSTREA
incubatrice	0				Ligament au niveau du provinculum	OSTREA

RANSON, la reconnaissance des espèces. Ceci s'explique par le fait que les larves, planctoniques, non fixées, ne subissent aucune déformation, ce qui n'est évidemment pas le cas des adultes fixés.

RANSON, en 1967 (206), a donné les macrophotographies ou les dessins des prodissoconques de :

4 espèces de Pycnodonta
17 espèces de Crassostrea
29 espèces d' Ostrea

La forme de la prodissoconque semble donc un bon critère d'identification des espèces. Nous serons amenés, pour décrire les trois espèces que nous avons étudiées plus particulièrement, à faire appel à d'autres critères.

Notre travail a été effectué sur :

O. edulis

C. angulata
C. gigas

Ostrea edulis Linné

Huître européenne, plutôt plate, ronde ou ovale. La valve gauche est légèrement bombée avec de vingt à trente cannelures qui irradient à partir du crochet. Elle possède des lamelles concentriques irrégulières. La valve droite ne présente pas de cannelures, mais possède de nombreuses lamelles concentriques. Le crochet est peu développé. Le ligament forme une saillie sur la valve droite. L'impression musculaire est légèrement excentrée; elle n'est pas pigmentée.

Elle ne possède pas de chambre promyaire. Les ostia et les oeufs sont relativement grands. Elle est hermaphrodite et incubatrice.

Crassostrea angulata Lamarck

" Huître du Portugal " ou " Huître portugaise ", de forme très variable, mais typiquement allongée. La valve gauche est très creuse avec des

cannelures (aux environs de six) qui irradient à partir du crochet. La valve supérieure est plate et souvent même concave. L'impression musculaire est typiquement violacée. Les cannelures sont aussi de couleur violacée. L'huître possède une chambre promyaire sur le côté droit. Les bords du manteau sont très pigmentés. Elle n'est pas incubatrice, déchargeant directement dans l'eau ovules et sperme.

Crassostrea gigas Thunberg

Huître japonaise, huître du Pacifique, de forme très variable, mais typiquement allongée. La valve gauche est très creuse avec des cannelures qui irradient à partir du crochet. Elle possède des lamelles concentriques grossières et largement espacées. La valve droite est plate et plus petite que la valve gauche. L'impression musculaire possède souvent de légères taches purpurines.

Elle possède une grande chambre promyaire sur le côté droit. Les bords du manteau sont très pigmentés. Elle n'est pas incubatrice, déchargeant directement dans l'eau ovules ou sperme.

Ces descriptions ont été tirées de YONGE (276), de l'excellente monographie de GALTSOFF (63) sur C. virginica et d'une étude de LEENHARDT (134).

Nos propres observations nous autorisent à ajouter que les échantillons de C. gigas sur lesquels nous avons opéré possèdent comme C. angulata des cannelures violacées. Tout au plus peut-on dire que les lamelles concentriques sont plus marquées sur C. gigas que sur C. angulata.

Les descriptions relatives aux trois genres cités, surtout celles des Crassostrea, font apparaître les difficultés d'identification des espèces d'huîtres.

RANSON affirme dans plusieurs publications que C. angulata et C. gigas pourraient ne former qu'une seule espèce. Dans un travail de 1948,

relatif à l'écologie et à la répartition géographique des Ostréidés vivants (201), il attire l'attention sur le fait qu'à l'égard de la salinité, comme à celui de la température, G. gigas du Japon se comporte comme G. angulata d'Europe.

Salinité optimum sur les bancs naturels au moment de l'émission des produits génitaux :		Températures optimum d'émission des produits génitaux :	
G. angulata	18 - 23 °/oo	G. angulata	18 - 25° C
G. gigas	18 - 23 °/oo	G. gigas	18 - 25° C

En outre, les caractères morphologiques de la coquille larvaire et de l'adulte de ces deux espèces sont si voisins qu'il semble difficile de les séparer. RANSON pense que ces deux espèces n'en constituent en fait qu'une seule.

RANSON ajoute : "La question est importante, car ce n'est pas le seul cas de présence d'une même espèce dans les eaux japonaises ou du Pacifique occidental et sur les côtes du Portugal, du Maroc et de la Méditerranée. Je ne fais ici que rappeler le problème connu. Je voudrais dire brièvement que deux hypothèses seulement sont valables pour expliquer un tel fait :

1 - Transport accidentel par les bateaux.

2 - Communication directe entre les deux zones du globe par la Méditerranée tertiaire. Mais, à cette époque géologique, les espèces actuelles n'existaient pas. Il faudrait donc que leurs ancêtres, isolés en deux lots au Tertiaire supérieur, eussent donné par évolution les mêmes espèces actuelles en deux points différents du globe. C'est une question délicate qui demande plus ample examen".

RANSON cite divers travaux qui semblent aller à l'encontre de son hypothèse pour démontrer qu'il n'en est rien.

En 1960 (205), RANSON écrit : "Il y a enfin quelques problèmes qui demandent à être examinés d'une manière approfondie comme l'assimilation qui me paraît devoir être faite un jour entre C. angulata Lmk et C. gigas Thunberg. S'il s'avérait exact, comme je le pense, qu'il s'agit d'une seule et même aspèce, c'est évidemment le nom de C. gigas Th. qui aurait la priorité. Elle aurait été importée autrefois dans l'embouchure du Tage, peut-être par les bateaux sur les parois desquels elle se serait fixée en Extrême-Orient, et qui aurait "terminé leur existence" quelque part dans l'embouchure du Tage. De là, l'espèce serait parvenue en Gironde et en Charente". Dans cette publication, figurent des dessins de la prodissoconque de Crassostrea angulata, mais on n'y trouve aucune représentation de la prodissoconque de Crassostrea gigas. Dans un important travail de 1967 (206), ne figurent ni la prodissoconque de Crassostrea angulata, ni celle de Crassostrea gigas.

Dans l'excellente revue "Recent advances in oyster biology", KORRINGA (130) exprime un certain scepticisme quant aux affirmations de RANSON : "D'un intérêt tout spécial est sa découverte que Gryphaea angulata et Gryphaea gigas se ressemblent tant, même quant aux caractères de la coquille larvaire, que RANSON incline à les considérer comme identiques. Il n'est pas certain que Gryphaea angulata ait vécu sur les côtes du Portugal et d'Espagne depuis des temps immémoriaux, car, selon RANSON, la découverte d'une coquille dans des restes de cuisine Gallo-Romains, près de Jarnac, est sujet à caution. Nous pouvons, cependant difficilement croire qu'il soit possible que Gryphaea angulata ait été transportée des côtes du Japon aux côtes du Portugal, par l'homme, il y a plus de mille ans. Des expériences d'élevage nous apprendront un jour si Gryphaea angulata et Gryphaea gigas sont réellement identiques, ou si, tout simplement, elles se ressemblent beaucoup".

Le même scepticisme affecte YONGE (276) qui écrit en 1960 : "Elle (Crassostrea angulata) ressemble, par les caractères de la coquille et par la température à laquelle elle se reproduit, à l'espèce japonaise, Crassostrea gigas, et la suggestion a été faite que ce serait peut-être cette espèce qui à un moment donné aurait été introduite accidentellement au Portugal,

peut-être attachée à la coque d'un navire. Il n'y a malheureusement aucune certitude sur la date à laquelle elle fit son apparition bien qu'il y ait des preuves qu'elle puisse avoir été présente en Europe dans les premières années de l'ère chrétienne. Ce qui serait beaucoup trop tôt pour qu'elle ait été transportée par un bateau venant d'Extrême Orient".

RAIMBAULT (195), dans la "Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes" de 1966, distingue encore les deux espèces, C. angulata Lamarck : "huître portugaise" européenne et C. gigas Thunberg : "huître japonaise" (Japon, Corée) cultivée aux U.S.A., mais il considère cette dernière comme semblable à C. angulata.

D'autres travaux méritent d'être cités. LOOSANOFF et DAVIS (138) rappellent les travaux de IMAI et SAKAI (104) sur l'obtention d'huîtres hybrides en croisant C. gigas et C. angulata; par contre, en croisant C. gigas avec C. virginica, C. echinata ou C. rivularis, il peut y avoir fertilisation croisée, mais les larves hybrides ne survivent pas.

Enfin, nous indiquerons les études sérologiques de NUMACHI (172) sur certaines races et certaines espèces d'huîtres dont C. gigas et C. angulata qui possèdent des antigènes différents et aussi des antigènes communs.

Il existe, à notre époque, d'autres critères notamment biochimiques pour différencier les genres, les espèces et même les sous-espèces.

TAXONOMIE BIOCHIMIQUE

Nous avons énoncé précédemment les règles d'une taxonomie rationnelle. Les caractères taxonomiques d'ordre biochimique doivent être évalués avec un esprit tout aussi critique.

Les critères biochimiques, d'intérêt taxonomique, ne doivent évidemment pas être sensibles ou n'être que peu sensibles :

- aux variations écologiques et physiologiques,
- aux variations physico-chimiques pouvant se produire "in vitro" lors de l'isolement ou de la conservation de la ou des substances choisies,
- aux variations analytiques dans l'étude de ces substances.

Les variations physico-chimiques et analytiques peuvent être minimisées en employant des méthodes bien standardisées et peu influencées par de légères différences expérimentales.

Parmi les constituants biochimiques susceptibles de donner les meilleurs renseignements sur la nature fondamentale de l'être vivant, ZUCKERKANDL et PAULING (277) ont proposé dans l'ordre :

1 - les molécules d'ADN,
2 - les molécules de m-ARN,
3 - la plupart des protéines.

Les molécules d'ADN contiennent l'information génétique. Or, les séquences des acides aminés constitutifs des protéines ne sont que la traduction des séquences des bases puriques et pyrimidiques des molécules d'ADN. Ceci confirme l'intérêt de l'étude des molécules protéiques en taxonomie.

Il faut ajouter que la permanence du vivant s'exprime principalement dans les protéines, "plus encore, sans doute, que dans les polynucléotides des gènes, plus variables à cause de la dégénérescence du code et

surtout privés de l'élément additionnel de stabilité évolutive fourni par la structure tertiaire des protéines" (DERANCOURT, LEBOR et ZUCKERKANDL - 37).

En ce qui concerne les protéines, il nous paraît intéressant de rappeler la valeur des méthodes d'étude :

- La solubilité d'un ensemble de protéines ou d'une protéine isolée, peut donner des renseignements taxonomiques, mais la méthode est longue et ne semble pas très féconde.

- La détermination de la composition totale en acides aminés, ainsi que l'étude des cartes peptidiques et des séquences d'acides aminés sont longues et délicates et ne s'appliquent qu'aux protéines séparées et purifiées.

- La détermination des propriétés enzymatiques et immunologiques est un excellent moyen d'information.

- L'étude comparative des propriétés électro-chimiques par échanges d'ions et surtout par électrophorèse est relativement aisée et des plus employée en taxonomie.

- L'étude de la répartition des poids moléculaires (et même des formes et des dimensions) est devenue très abordable avec la mise au point de nouvelles techniques chromatographiques et électrophorétiques simples.

Toutes ces méthodes ont leurs limites. Mais l'emploi de l'une permet de contrôler et préciser les résultats de l'autre. Nous en reparlerons lors de l'exposé de nos travaux personnels et de leur discussion.

Il ne faut cependant pas limiter aux seules macromolécules l'exclusivité d'un intérêt taxonomique. L'étude des petites molécules a son importance. "Elles sont indubitablement présentes ou absentes parce que leur synthèse est codée ou non dans le génome". Mais, évidemment, elles ne sont pas le reflet <u>direct</u> du code génétique (HEGLOP - HARRISON - 90).

Ainsi, HASLEWOOD compare les sels biliaires de différents groupes de vertébrés, d'affinités taxonomiques mal connues (86).

Sur l'impact de la taxonomie biochimique, nous citerons l'opinion émise par MAYR (147) en 1964. Cet auteur estime que la biochimie (comme la sérologie et la physiologie) est particulièrement utile pour "l'identification et la définition des unités de base : races, populations, espèces, ainsi que pour l'assemblage de ces unités en agrégats, groupes, taxa. Cependant, il ne semble pas penser que les disciplines énoncées ci-dessus puissent être d'un grand secours pour l'attribution d'un taxon donné à une catégorie taxonomique. C'est une chose que de grouper en taxa, et une autre d'assigner un rang à ces taxa : famille, genre ou espèce.

On peut se demander si la phylogénie peut rendre des services à la taxonomie. On ne peut baser une classification sur la phylogénie, car on ne la connait pas, en fait. Mais, devant plusieurs classifications possibles, il faut donner la préférence à celle qui est le plus en accord avec la phylogénie reconstruite (147). On peut envisager l'étude de la phylogénie des protéines en comparant "des protéines homologues isolées à partir d'organismes situés à différents niveaux dans une même série phylétique" (FLORKIN - 56). Mais cette phylogénie des protéines doit toujours rester subordonnée à la phylogénie classique.

APPLICATION DE LA TAXONOMIE BIOCHIMIQUE A LA CLASSIFICATION DES MOLLUSQUES

Si les Vertébrés ont donné lieu au plus grand nombre de travaux de taxonomie biochimique, les Invertébrés ont aussi attiré l'attention des chercheurs. Nous allons exposer par ordre chronologique quelques travaux relatifs à l'Embranchement des Mollusques; puis nous dresserons un tableau récapitulatif faisant apparaître :

- la méthode employée,
- l'animal étudié,
- le tissu analysé.

La majorité des travaux analysés a été effectuée dans un but taxonomique, mais certains ont une portée plus générale.

Exposé chronologique des travaux.

MEHL et SEXTON (148), en 1942, étudient par électrophorèse de frontières des extraits musculaires d'Octopus. Ils comparent les résultats obtenus avec ceux d'extraits de muscle squelettique de rat.

C'est à la même méthode que DUBUISSON et ROUBERT (46) font appel pour étudier, en 1947, des extraits de muscle pédieux du gastéropode Murex brandaris. Si le diagramme obtenu est très différent de celui du lapin, il montre des ressemblances avec celui de la grenouille. Le muscle lisse à contraction lente d'un invertébré marin poïkilo-osmotique se trouve donc, sur ce point, très comparable au muscle strié à contraction rapide d'un amphibien.

Toujours par électrophorèse de frontières, DEUTSCH et MC SHAN (41), en 1949, étudient le sérum sanguin de quelques animaux "inférieurs" dont un gastéropode terrestre du genre Polygiria. Tous les systèmes protéiques étudiés montrent des aspects électrophorétiques caractéristiques des espèces.

En 1954, RANKE et BRAMSTEDT (197) soumettent à l'électrophorèse sur papier, des extraits de poissons, de crustacés et de moule. Les résultats obtenus sont spécifiques des espèces.

Par chromatographie de partage sur papier, KIRK, MAIN et BEYER (122) en 1954 étudient les extraits des muscles pédieux de sept espèces de gastéropodes terrestres. Les substances séparées sont mises en évidence par leur absorption ultra-violette ou par leur fluorescence. Chaque espèce donne un aspect bien particulier. L'âge, l'origine géographique et la nourriture n'apportent pas de variations significatives. Cette méthode, affirment les auteurs, est un outil de valeur pour le taxonomiste.

Par la méthode de KIRK, MAIN et BEYER modifiée, WRIGHT, HARRIS et CLAUGHER (268) en 1957, et WRIGHT (267), en 1959, font une étude taxonomique du genre Limnaea. Ils étudient ainsi le mucus de plusieurs espèces de limnées, la révélation des chromatogrammes se faisant de façons diverses : fluorescence, ninhydrine, nitrate d'argent ammoniacal, etc ... Le résultat le plus significatif est la démonstration de la présence de substances spécifiques de l'espèce dans le mucus des gastéropodes. Les auteurs indiquent l'intérêt parasitologique de leurs travaux.

En 1958, WOODS, PAULSEN, ENGLE et PERT (266) séparent, par électrophorèse en gel d'amidon, les protéines du sérum de quelques invertébrés, notamment un céphalopode, Loligo pealii, qui donne deux constituants importants de mobilités moyennes et un bivalve, Crassostrea virginica, qui donne deux constituants de faible mobilité. Le sérum de cette huître américaine ne contient pas de protéine respiratoire. Devant les résultats obtenus, les auteurs insistent sur l'intérêt taxonomique de la méthode.

INOUE (105), en 1960, étudie par électrophorèse sur papier les protéines et les polysaccharides du stylet cristallin de quatre espèces de bivalves.

En 1961, COLLYER (26) étudie par chromatographie de partage sur papier des extraits de muscle pédieux de gastéropodes marins, le révélateur étant la ninhydrine. Il met ainsi en évidence des différences entre un Nassarius d'identification difficile, provenant de l'Essex, et un Nassarius reticulatus, provenant des régions de Plymouth et du nord du Pays de Galles. Les animaux ont été conservés un certain temps dans les mêmes conditions. Ayant éliminé l'action des facteurs d'environnement, l'auteur pense avoir mis en évidence des différences d'ordre génétique; en outre, il constate des différences, d'ailleurs réversibles, dues à l'état de jeûne.

TRAN VAN KY, ROSE et LAUDE (246) affirment que l'étude immuno-électrophorétique de la structure antigénique des mollusques est susceptible de résoudre certaines difficultés de leur taxonomie. Dans leurs travaux de 1962, les antigènes sont préparés à partir des corps entiers de gastéropodes d'eau douce : Australorbis glabratus, Planorbis corneus, Limnaea palustris, L.sta-

gnalis et L. limosa. Les auteurs constatent "que les communautés antigéniques mises en évidence entre les diverses espèces considérées correspondent à celles qui étaient prévisibles en fonction de leur classification actuelle". La méthode semble fructueuse lorsqu'il s'agit de comparer des espèces voisines; par contre, la méthode perd sa valeur lorsque les espèces s'éloignent dans la systématique. Les auteurs donnent un prolongement parasitologique à leurs travaux.

La même année, CHENG et SANDERS (24) séparent en cinq fractions, par électrophorèse sur papier, les protéines du sérum du gastéropode Viviparus malleatus.

Toujours la même année, NUMACHI (172) dont nous avons déjà parlé dans le chapitre de taxonomie classique, se livre à une étude sérologique de diverses espèces et races d'huîtres en employant des techniques de précipitation et d'immunodiffusion. Les antigènes sont des sérums de Crassostrea gigas (quatre races locales), C. rivularis, C. angulata, C. virginica et Ostrea edulis d'une part et des extraits de larves de C. gigas, C.rivularis et C. angulata d'autre part. L'auteur constate que les cinq espèces d'huîtres ont des antigènes communs ou similaires et que quatre d'entre elles ont des antigènes spécifiques alors que C. rivularis n'en a pas. Les quatre races de C. gigas ont en commun un antigène spécifique de gigas qui est absent dans les autres espèces; elles montrent en outre des différences antigéniques en accord avec leur degré d'isolement géographique. Enfin, des différences entre les antigènes solubles des extraits de larves ont été mises en évidence.

En 1963, DENUCE et CUSHING (36) comparent immunologiquement les hémocyanines de divers crustacés et de quelques mollusques dont Haliotis rufescens et Octopus (bimaculatus ?). Les antigènes des mollusques ne réagissent pas avec les sérums anti-crustacés.

La même année, WRIGHT et ROSS (269) étudient par électrophorèse sur acétate de cellulose les protéines sanguines et les protéines des oeufs d'Australorbis glabratus. Les constituants protéiques du sang, variant avec

l'âge, ne peuvent être utilisés dans la taxonomie de ces gastéropodes. Par contre, les constituants protéiques des oeufs ne changent pas qualitativement pendant le développement. Leur étude apporte donc un critère taxonomique valable.

En 1964, KOBAYASHI (124)(125) effectue des électrophorèses sur papier et acétate de cellulose du liquide extrapalléal de diverses espèces de mollusques. Il compare les bivalves à coquille calcitique et ceux à coquille en aragonite.

CHENG (23) continue ses travaux, en 1964, en choisissant l'acétate de cellulose comme support d'électrophorèse et en concentrant les sérums des mollusques par lyophilisation. Il étudie six mollusques marins et trois mollusques d'eau douce. Les bivalves étudiés sont Ensis directus, Modiolus demissus, Mytilus edulis et Musculium partumeium. Les autres mollusques étudiés sont des gastéropodes. L'auteur sépare trois fractions chez E. directus, deux chez M. demissus, deux chez M. edulis, une chez M. partumeium. Chaque espèce peut être identifiée par son aspect électrophorétique. L'auteur ne peut encore tirer de conclusion concernant les relations phylogénétiques.

DAVIS et LINDSAY (33), en 1964, appliquent la disc électrophorèse à la séparation d'extraits protéiques du muscle pédieux et des constituants protéiques du sérum d'Helix pomatia. Les résultats indiquent que "l'augmentation de la taille et les changements physiologiques qui l'accompagnent affectent uniquement la densité des protéines sanguines et que la séquence linéaire des protéines du muscle pédieux comme celle du sang sont des caractères valables pour une population d'une espèce". Les auteurs, en étudiant le gastéropode Oncomelania formosana trouvent la méthode assez sensible pour montrer des variations entre les populations d'une espèce.

En 1964, HILLMAN (92) met en évidence, par chromatographie sur papier, des différences génétiques intraspécifiques chez l'huître américaine Crassostrea virginica. L'auteur conserve pendant un certain temps, dans un même aquarium, les deux populations d'huîtres étudiées, originaires de deux régions bien différentes. Il prélève la partie nacrée du muscle adducteur et

la presse sur le papier de chromatographie ou en fait un extrait alcoolique. Il estime pouvoir étudier ainsi un mélange d'acides aminés et de petits peptides qu'il révèle, après séparation par la ninhydrine. Les aspects chromatographiques obtenus sont reproductibles et différents d'une population à l'autre.

Le même auteur confirmera l'année suivante (93) les résultats de son étude des populations allopatriques de C. virginica en appliquant une méthode adaptée de la chromatographie en couche mince.

HUNEEUS-COX (102) étudie, en 1964, les protéines de l'axoplasme du céphalopode Dosidius gigas, par disc électrophorèse et par des méthodes immunologiques.

En 1965, WRIGHT et ROSS (270) continuent leurs travaux en séparant toujours par électrophorèse sur acétate de cellulose, les protéines des oeufs de plusieurs espèces de Bulinus et de Biomphalaria, gastéropodes planorbidés. Ils arrivent ainsi à différencier, au sein d'une même espèce, différentes populations de mollusques.

L'année suivante (271), ils étudient les protéines des oeufs de toutes les espèces connues du groupe Bulinus africanus et de la plupart de celles du groupe B. forskalii. Les résultats montrent, qu'en général, les variations entre populations de la même espèce sont plus importantes que celles qui existent entre espèces du même groupe. Cette étude taxonomique possède un intérêt indéniable en parasitologie.

FOCANT et PECHERE (58), dans leur important travail de 1965, étudient les protéines de faible poids moléculaire des myogènes des vertébrés inférieurs. Ils donnent les profils chromatographiques, sur colonne de Sephadex G-75, des myogènes de divers invertébrés, dont un gastéropode pulmoné (Ampullariides)

ROSE, OSTEUX, ROSE et TRAN VAN KY (214) continuant en 1966 leurs travaux sur les mollusques, étudient des extraits totaux de gastéropodes et

plus particulièrement de Bulininae par immuno-électrophorèse en agarose et par disc électrophorèse. Seule cette dernière technique permet la différenciation d'espèces très voisines et de souches d'une même espèce.

En 1966, MONNET, MORE, MORE et POISBEAU (153)(155) appliquent la méthode de disc électrophorèse à l'étude des protéines solubles des muscles adducteurs de Ostrea edulis, Crassostrea angulata, Tapes decussatus, Mytilus edulis et Mya arenaria. Les aspects électrophorétiques de ces bivalves sont très différents les uns des autres.

LAPORTE (131), en 1966, dans sa thèse sur les protides de l'huître C. angulata de l'étang de Thau, effectue des électrophorèses sur papier d'extraits du manteau, de la glande digestive et du muscle adducteur. Ce dernier présente deux bandes protéiques de mobilité assez voisines; la bande la plus rapide est la plus importante; elle est faiblement glycoprotéique. L'auteur note, en outre, une fraction polysaccharidique de mobilité inférieure aux deux bandes protéiques.

MORELAND, WATTS et VIRDEN (157)(158), dans une étude sur les phosphagène kinases des échinodermes et des mollusques, effectuent, en 1967, des chromatographies sur colonne de Sephadex G-100 et des électrophorèses en gel d'amidon d'extraits musculaires de divers bivalves : Chlamys opercularis, Cardium edule, Barnea parva.

DAVIS et LINDSAY (34) continuent, en 1967, leur étude taxonomique par disc électrophorèse. Chez le gastéropode Helix pomatia, ni les protéines de l'hémolymphe, ni les protéines du muscle pédieux n'offrent de changement qualitatif en fonction de la taille du mollusque. Lorsque l'on relie la densité des fractions protéiques à la taille du gastéropode, on observe des variations quantitatives avec l'hémolymphe, mais non pas avec l'extrait de muscle pédieux. Enfin, l'aspect électrophorétique des extraits de muscle pédieux reste stable malgré l'hibernation ou le maintien en laboratoire.

L'étude d'extraits de muscle pédieux de quatre populations de Pomatiopsis lapidaria fait apparaître des variations significatives entre les populations. Mais, l'espèce reste toujours caractérisée par un aspect densi-

tométrique clairement reconnaissable dans chaque population. L'intérêt taxonomique de l'extrait de muscle pédieux comme substrat et de la disc électrophorèse comme méthode apparaît clairement. Les auteurs concluent en soulignant les limites de cette méthode.

TRAVIS, FRANCOIS, BONAR et GLIMCHER (247), en 1967, font une étude comparative de la matrice organique des tissus minéralisés de divers invertébrés dont trois mollusques bivalves : Mytilus edulis, Crassostrea virginica, Mercenaria mercenaria. Ils emploient la microscopie électronique, la diffraction des rayons X et l'analyse des acides aminés. Les protéines des coquilles de ces mollusques diffèrent entre elles par leur composition en acides aminés, mais possèdent plusieurs caractères communs.

En 1968, MORE, MORE, POISBEAU et MONNET (156) adaptent la chromatographie d'exclusion diffusion en couche mince à l'étude d'un extrait protéique de muscle adducteur total de Crassostrea angulata.

Classification des travaux et discussion.

Comme nous l'avons déjà indiqué, tous les travaux exposés et réunis dans le tableau II n'ont pas un but taxonomique, mais tous peuvent être exploités dans ce sens.

Les méthodes employées ont été très diverses. L'électrophorèse et l'immuno-électrophorèse ont été manifestement les plus utilisées. Elles sont des méthodes de choix. L'électrophorèse de frontières et l'électrophorèse sur papier employées d'abord ont été progressivement remplacées par l'électrophorèse en milieu gélifié : acétate de cellulose, gel d'amidon ou gel de polyacrylamide. La chromatographie a servi à la séparation des acides aminés, des oligo-peptides et de produits indéterminés; elle a été aussi appliquée à l'analyse des protéines. Les méthodes immunologiques sont bien représentées et certains auteurs en ont précisé les limites (214).

Sur les trente-cinq travaux analysés, vingt-quatre sont purement taxonomiques, les bivalves sont traités quatorze fois et les ostreidae dix fois (Tableau III).

TABLEAU II

Tableau récapitulatif des travaux de biochimie taxonomique sur les Mollusques.

Tissu	Méthode		Taxo	Animal	Ostr.	Auteurs
Muscle	Electrophorèse	Electrophorèse de Frontières		Céphalopode		Mehl, Sexton 1942
		Electrophorèse de Frontières		Gastéropode		Dubuisson, Roubert 1947
		Electrophorèse sur papier		BIVALVE		Ranke, Bramstedt 1954
		Electrophorèse sur papier		BIVALVE	+	Laporte 1966
		Disc Electrophorèse	+	Gastéropode		Davis, Lindsay 1964
		Disc Electrophorèse	+	BIVALVE	+	Monnet, Moré et coll. 1966
		Disc Electrophorèse	+	Gastéropode		Davis, Lindsay 1967
	Chromatographie	Chromatographie sur papier	+	Gastéropode		Kirk, Main et coll. 1954
		Chromatographie sur papier	+	Gastéropode		Collyer 1961
		Chromatographie sur papier	+	BIVALVE	+	Hillman 1964
		Chromatographie sur papier	+	BIVALVE	+	Hillman 1965
		Chromatographie sur gel		Gastéropode		Focant, Pechère 1965
		Chromatographie sur gel		BIVALVE		Moreland, Watts et coll. 1967
		Chromatographie sur gel	+	BIVALVE	+	Moré, Moré et coll. 1968
Sang	Electrophorèse	Electrophorèse de Frontières	+	Gastéropode		Deutsch, McShan 1949
		Electrophorèse en gel d'amidon	+	BIVALVE, Céphalopode	+	Woods, Paulsen et coll. 1958
		Electrophorèse sur papier	+	Gastéropode		Cheng, Sanders 1962
		Electrophorèse sur acétate de cellulose	+	Gastéropode		Wright, Ross 1963
		Electrophorèse sur acétate de cellulose	+	BIVALVE, Gastéropode		Cheng 1964
		Disc Electrophorèse	+	Gastéropode		Davis, Lindsay 1964
		Disc Electrophorèse	+	Gastéropode		Davis, Lindsay 1967
		Immunoprécipitation	+	BIVALVE	+	Numachi 1962
		Immuno-électrophorèse		Gastéropode, Céphalopode		Denucé, Cushing 1963
Mucus		Chromatographie sur papier	+	Gastéropode		Wright, Harris et coll. 1957
		Chromatographie sur papier	+	Gastéropode		Wright 1959
Oeuf		Electrophorèse sur acétate de cellulose	+	Gastéropode		Wright, Ross 1963
		Electrophorèse sur acétate de cellulose	+	Gastéropode		Wright, Ross 1965
		Electrophorèse sur acétate de cellulose	+	Gastéropode		Wright, Ross 1966
Animal entier		Immuno-électrophorèse	+	Gastéropode		Tran Van Ky, Rose et coll. 1962
		Immuno-électrophorèse et Disc Electrophorèse	+	Gastéropode		Rose, Osteux et coll. 1966
		Immunoprécipitation et immunodiffusion	+	BIVALVE	+	Numachi 1962
Stylet cristallin		Electrophorèse sur papier		BIVALVE		Inoue 1960
Liquide extrapalléal		Electrophorèse sur papier et acétate de cellulose		BIVALVE	+	Kobayashi 1964
Axoplasme		Immunodiffusion et Disc Electrophorèse		Céphalopode		Huneeus-Cox 1964
Tissu Minéralisé		Microscope électronique, diffraction aux R.X. et analyse des A.A.		BIVALVE	+	Travis, François et coll. 1967

TABLEAU III

Répartition des Travaux et des Mollusques étudiés.

Travaux exposés	Mollusques étudiés	
35 dont 24 taxonomiques	Céphalopodes 4	
	Gastéropodes 20	
	Bivalves 14	Ostreidae 10

Remarque : On note l'absence des Aplacophores, Polyplacophores, Monoplacophores et Scaphopodes.

Les protéines sont les constituants biochimiques les plus étudiés. On remarque la prépondérance du tissu musculaire et du sang sur les autres tissus. Plusieurs travaux ont été effectués sur l'animal entier ou sur l'oeuf. En dehors d'une étude sur l'axoplasme, nous n'avons rencontré aucune publication sur les tissus épithéliaux, conjonctifs et nerveux, sans doute en raison des difficultés de prélèvement et des dangers de contamination par des tissus étrangers. Par exemple, le système nerveux de l'huître est de dissection extrêmement délicate, car il est petit, non pigmenté et noyé dans du tissu conjonctif (63).

Le stylet cristallin, structure typique des Bivalves, n'est pas une structure permanente. Chez les Ostreidae, il se dissout très rapidement dès que l'on retire ces mollusques de l'eau (63).

Le sang est relativement abondant chez l'huître, mais son prélèvement est délicat. Si, pour le recueillir, on dilacère les branchies (57), on risque une pollution cytoplasmique; la ponction péricardique, nous le savons par expérience, amène souvent une pollution par les produits génitaux. Ces souillures sont d'autant plus graves que la concentration du sang en pro-

téine est très faible : 0,2 % chez Ostrea edulis (213). L'huître est en outre dépourvue de régulation anisosmotique extra-cellulaire et, de ce fait, son sang doit être extrêmement sensible aux facteurs d'environnement. Enfin les travaux que nous avons exposés précédemment montrent une certaine variation des protéines du sérum avec la taille de l'animal, du moins chez les gastéropodes.

Le choix du tissu musculaire semble plus intéressant. Il a été abondamment utilisé dans des travaux taxonomiques, tant pour les invertébrés que pour les vertébrés.

Nous avons déjà exposé les résultats satisfaisants que divers chercheurs et nous-mêmes avons obtenu avec ce tissu chez les gastéropodes et les bivalves.

Parmi les travaux sur les vertébrés, nous citerons, à titre d'exemple, ceux de CONNELL (28), et ceux de TUYUKI, ROBERTS et coll. (249)(250)(251)(252) qui portent sur les poissons et confirment l'intérêt de l'étude des protéines musculaires en taxonomie.

En ce qui concerne l'organe étudié, le muscle pédieux a été retenu pour les gastéropodes et le muscle adducteur pour les bivalves. Chez les Ostreidae, le muscle pédieux n'existe plus et les rétracteurs du pied n'y sont conservés que sous forme vestigiale. Le muscle cardiaque est bien individualisé, facile à prélever, mais de petite taille. Le manteau et les branchies contiennent des fibres musculaires, mais elles sont noyées dans une proportion élevée de conjonctif.

Par contre, le muscle adducteur, d'origine palléal, est un organe massif, de prélèvement aisé, dont les tissus sont homogènes. Il faut cependant faire les réserves dont nous parlerons lors de l'extraction des protéines, tenant à la présence en faibles quantités de sang et de conjonctif.

Le muscle adducteur figure en bonne place dans la définition des Bivalves. S'il existe chez les Gastéropodes bivalves (Tamanovalva, Midorigai)

il provient probablement de la différentiation du muscle rétracteur de la tête (207). On ne peut considérer ces gastéropodes comme appartenant à la souche ancestrale des bivalves (70). Il serait intéressant d'examiner leurs protéines musculaires ainsi que celles des brachiopodes, qui furent classés autrefois parmi les mollusques et qui possèdent une musculature complexe dont des muscles adducteurs les uns à contraction rapide, les autres à contraction lente (70). Mais, ceci n'est qu'un phénomène de convergence.

Le muscle adducteur des Ostreidae comprend deux parties distinctes : une partie transparente et une partie nacrée, séparées par une cloison conjonctive. L'étude des protéines sarcoplasmiques de ces deux tissus n'a pas été approfondie à notre connaissance.

Les protéines des tissus musculaires peuvent être différenciées en deux grandes catégories :

- les protéines de structure, myofibrillaires
- et les protéines solubles, sarcoplasmiques.

Les protéines solubles sont celles qui sont le plus communément choisies par les chercheurs pour les études de taxonomie biochimique; à en juger par les résultats obtenus, le choix est judicieux. L'ensemble des protéines sarcoplasmiques contient peut-être plusieurs centaines de protéines différentes dont un bon nombre est doué de propriétés enzymatiques (180). Les études physiologiques et phylogénétiques sur ces protéines semblent devoir être extrêmement fructueuses.

L'étude des protéines de structure peut aussi apporter des renseignements taxonomiques. Il existe une certaine spécificité de ces protéines, tant chez les Vertébrés (tropomyosine des mammifères (219), actomyosine des poissons (255)) que chez les Invertébrés (paramyosine des Mollusques (150) (121)). Mais, cette étude, longue et difficile, est d'un intérêt plutôt phylogénétique que purement taxonomique.

téines sarcoplasmiques contient peut-être plusieurs centaines de protéines différentes dont un bon nombre est doué de propriétés enzymatiques (180).

L'étude des protéines de structure peut aussi éprouver des renseignements taxonomiques. Il existe une certaine spécificité de ces protéines, tant chez les Vertébrés (tropomyosine des mammifères (819), actomyosine des poissons (255)) que chez les Invertébrés (paramyosine des Mollusques (150) [illegible] logénétique que purement taxonomique.

DEUXIEME PARTIE

LE MUSCLE ADDUCTEUR DES OSTREIDAE

Dans les travaux exposés précédemment et réalisés surtout dans un but taxonomique, nous avons insisté sur l'importance du muscle adducteur des Bivalves comme source d'information.

Pour une étude des protéines de quelques espèces d'Ostreidae, nous avons retenu le muscle adducteur.

Nous présenterons ce muscle, tant au point de vue phylogénétique et ontogénétique, qu'au point de vue structural et physiologique.

Notre étude portera plus particulièrement sur les trois espèces : O. edulis, C. angulata et C. gigas. Mais, nous ferons appel à des résultats obtenus sur d'autres espèces afin de préciser certaines notions.

ASPECT PHYLOGENETIQUE

La phylogénèse des Bivalves peut être reconstruite à partir d'un mollusque ancestral formé d'une coquille en forme de dôme à laquelle l'animal est rattaché par une série de muscles coquilliers symétriques. Neopilina, Monoplacophore vivant découvert en 1952 est très ressemblante à ce mollusque ancestral hypothétique (135).

Le manteau, prenant de l'extension, s'insère à la périphérie de la coquille par des muscles palléaux.

L'ensemble manteau / coquille s'étendant, on assiste à une compression latérale de l'animal. Le manteau se divise en deux lobes pourvus chacun d'un centre de calcification. L'isthme palléal, qui relie ces deux lobes, secrète la couche interne du ligament. Cet isthme se raccourcit et à ses extrémités antérieures, les muscles palléaux se fusionnent, donnant naissance aux deux muscles adducteurs. La formation des muscles adducteurs et celle du ligament ont été simultanées. Les valves se ferment et le ligament se comprime lorsque les muscles adducteurs se contractent et l'élasticité du ligament fait que les deux valves s'ouvrent lorsque l'adducteur se relâche. La découverte récente de gastéropodes bivalves vivants est "la preuve tangible des adaptations entraînées par le passage de l'univalve au bivalve, tel qu'il a dû se produire lors de l'évolution différentielle des premiers Mollusques" (TERMIER, 1968)(242).

On a tenté d'expliquer l'évolution du stade dimyaire au stade monomyaire qui est un caractère de tous les Ostreidae, mais qui ne leur est cependant pas spécifique. YONGE expose magistralement la question dans son travail de 1953, "The monomyarian condition in the Lamellibranchia" (275).

En 1960 (276), il résume le problème d'une façon moins scientifique, mais plus abordable.

On peut penser qu'au cours de l'évolution, les huîtres ont passé par le stade d'attachement par byssus qui amène d'une façon générale la condition hétéromyaire avec réduction du muscle adducteur antérieur et réorganisation du corps, comme chez Mytilus. Un stade ultérieur amène la condition monomyaire où le muscle adducteur antérieur disparaît. C'est le cas de "l'huître" perlière, Pinctada, qui, toujours attaché par un byssus, a cependant abandonné la position verticale et se trouve en position horizontale couchée sur le côté droit.

L'huître actuelle est couchée sur le côté gauche et cémentée au substrat. Elle ne possède pas de byssus. Nous verrons cependant, au cours de l'ontogénèse, qu'elle passe par un stade à byssus. Autour du muscle adducteur postérieur, désormais unique et en position centrale, les divers organes se sont regroupés d'une façon fonctionnelle du point de vue de la nutrition, de la respiration et de la reproduction. Comme effets secondaires du passage à l'état monomyaire, on remarque chez l'huître, l'absence de dents à la charnière, l'absence de pied. Les muscles palléaux qui irradient à partir de l'adducteur ne sont plus rattachés à la coquille sur le pourtour du manteau.

On remarquera, outre la glande à byssus, des dents à la charnière et la présence d'un pied à certains stades de l'évolution ontogénétique.

ASPECT ONTOGENETIQUE

Nous avons exposé la phylogénèse des huîtres autant qu'il est possible de la reconstruire.

Il est intéressant d'en suivre l'ontogénèse, pour elle-même, et comme support de la phylogénèse puisqu'il est communément admis que "l'ontogénèse suit la phylogénèse".

Nous exposerons cette ontogénèse sous une forme schématique en insistant sur le muscle adducteur (figure 5)

L'oeuf fécondé atteint les stades morula puis gastrula et se transforme en larve trochophore munie d'une couronne ciliée ou prototroche et d'une coquille unique en forme de selle et de nature cuticulaire.

Cette larve, encore appelée typembryon, commence à développer une coquille double, puis après avoir tourné autour de son axe dorso-ventral se met à nager. Elle se transforme en larve véligère connue sous les noms de phylembryon, prodissoconque I, ou "larve de forme D". Elle est en effet munie de deux valves symétriques ayant une charnière droite, sans crochet ni dent; c'est la prodissoconque primitive. Elle possède un SEUL MUSCLE ADDUCTEUR QUI EST ANTERIEUR.

Puis cette larve, continuant à se développer, devient ce que l'on nomme parfois une larve "mature". Le velum est très bien développé et muni de muscles rétracteurs puissants. Le pied est formé; à sa base, se trouve une glande à byssus. La prodissoconque, appelée prodissoconque définitive, est munie d'un crochet et d'une charnière crénelée. Les deux valves sont reliées par DEUX MUSCLES ADDUCTEURS, L'UN ANTERIEUR et L'AUTRE POSTERIEUR. Ce dernier est situé au-dessus du tube digestif postérieur.

Cette larve planctonique va chercher à se fixer. Lorsqu'elle trouve l'endroit idéal, elle vide entièrement sa glande à byssus et se fixe en cémentant sa valve gauche sur le substrat choisi.

A ce moment, commence une métamorphose considérable avec disparition du velum et du pied, rotation, de quatre-vingt dix degrés, du corps dans la coquille, disparition du muscle adducteur antérieur. SEUL L'ADDUCTEUR POSTERIEUR SUBSISTE, conservant d'ailleurs toujours ses relations avec l'anus. Une coquille nouvelle et définitive se construit : la dissoconque. La figure 5 rend compte de ce cycle et de quelques particularités propres à C. angulata et à O. edulis.

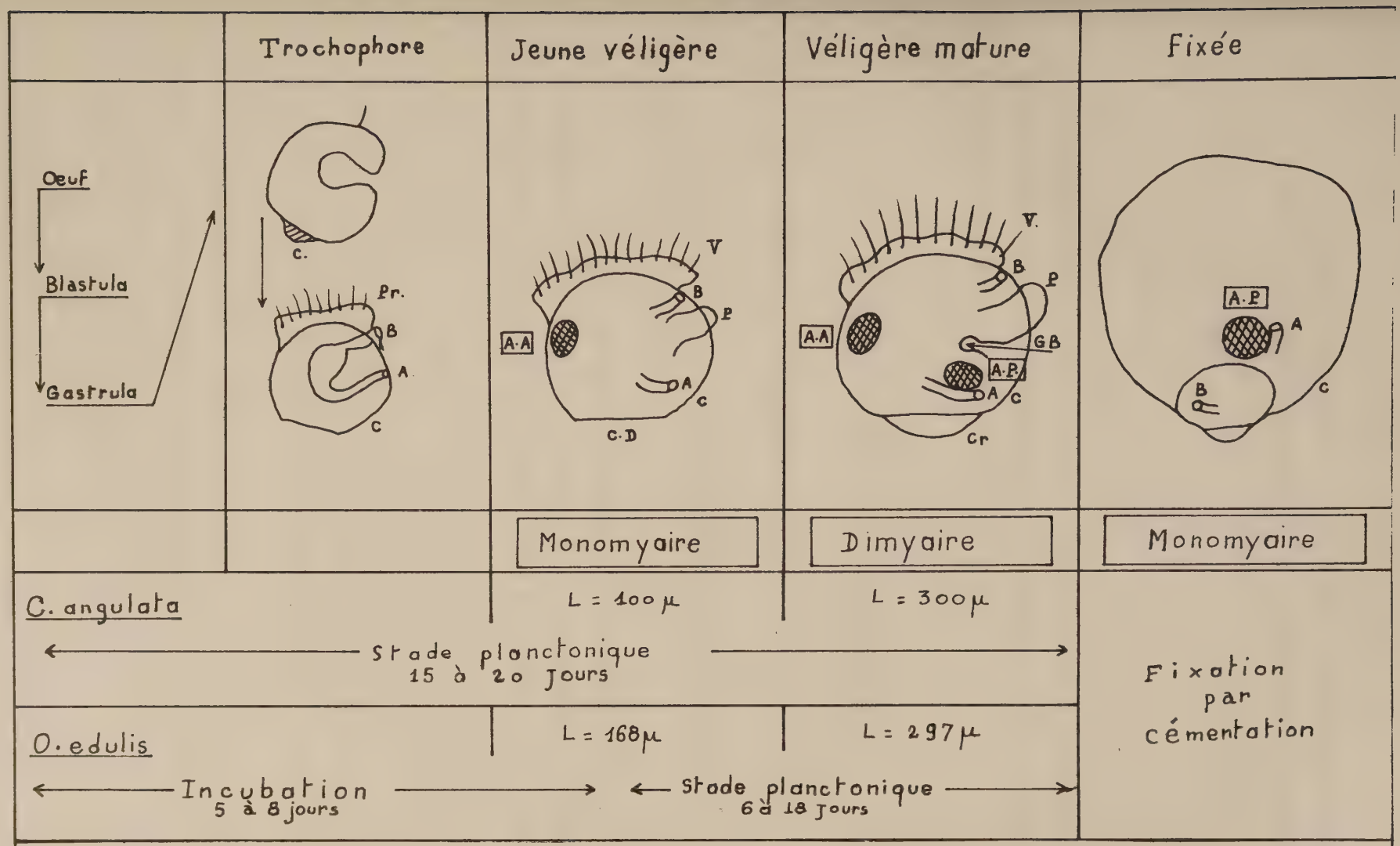


Figure: 5 : Ontogénèse de l'huître. A,anus; A-A,adducteur antérieur; A-P, adducteur postérieur; B,bouche; C,coquille CD,charnière droite; Cr,crochet; GB,glande à byssus; P,pied; Pr,Prototroche;V,velum.
Les muscles rétracteurs du velum, ainsi que de très nombreux organes n'ont pas été représentés.
La trochophore possède une glande coquillère et diffère ainsi de la trochophore typique.
Ce tableau est une synthèse de divers renseignements trouvés chez GALTSOFF (63), RAIMBAULT (195), RANSON (204) YONGE (276).

La musculature larvaire dérive non seulement du mésenchyme larvaire, mais aussi du mésoderme primaire (207). Nous avons trouvé peu de renseignements sur la structure des muscles larvaires. On remarque cependant que les rétracteurs du velum sont formés de fibres musculaires striées (63).

La musculature adulte des mollusques se développe généralement à partir du mésoderme indépendamment de la musculature larvaire. Cependant, chez quelques bivalves, et c'est le cas des huîtres, une certaine partie de la musculature larvaire persiste chez l'adulte. Le cas du muscle adducteur postérieur confirme ce fait (207).

LE MUSCLE ADDUCTEUR DE L'HUITRE ADULTE

Anatomie. Morphologie.

L'huître à la fin de sa métamorphose est redevenue monomyaire comme au stade véligère.

Ce muscle adducteur, comme ceux de divers bivalves, a donné lieu à de nombreux travaux. C'est, sans doute, son étrange physiologie qui a provoqué toutes ces recherches menées jusqu'à l'échelon moléculaire.

Nous ne pouvons en trouver une meilleure définition que celle qu'a donné MARCEAU en 1909 (144) : "Ainsi que leur nom l'indique, les muscles adducteurs sont des organes contractiles destinés à produire le rapprochement plus ou moins durable des valves des Acéphales que l'élasticité de leur ligament d'union tend constamment à écarter l'une de l'autre."

Nous devons avoir toujours à l'esprit la notion de l'antagonisme muscle - ligament. Il faut en outre noter que le ligament est interne chez les Ostreidae, ce qui procure un mécanisme d'ouverture plus efficace et plus rapide que ne le ferait un ligament externe (274).

L'adducteur des huîtres se présente comme une masse musculaire réniforme de position centrale ou subcentrale chez O. edulis. Dans le genre Crassostrea, il occupe une position de plus en plus éloignée du ligament au fur et à mesure que le mollusque se développe. L'observation de l'impression musculaire rend d'ailleurs compte de ce fait.

Il est bordé antérieurement et ventralement par la masse viscérale. Postérieurement et dorsalement se trouvent la chambre épibranchiale et le cloaque. La cavité péricardique est étroitement accolée à sa face antérieure. En position postéro-ventrale, le ganglion viscéral repose sur le muscle. Dorsalement, l'adducteur supporte l'organe palléal et le rectum. Il faut noter que dans le genre Crassostrea, du côté droit de l'animal, le manteau n'est pas attaché à la masse viscérale, entre le muscle et le capuchon céphalique, formant ainsi la chambre promyaire. Celle-ci n'existe pas dans le genre Ostrea (figure 3).

On remarque immédiatement que le muscle est formé de deux parties bien distinctes, une partie antérieure d'aspect transparent, et une partie postérieure nacrée (figure 5 bis). Les deux parties sont enveloppées d'une membrane conjonctive. Entre elles, se situe une cloison conjonctive bien individualisée.

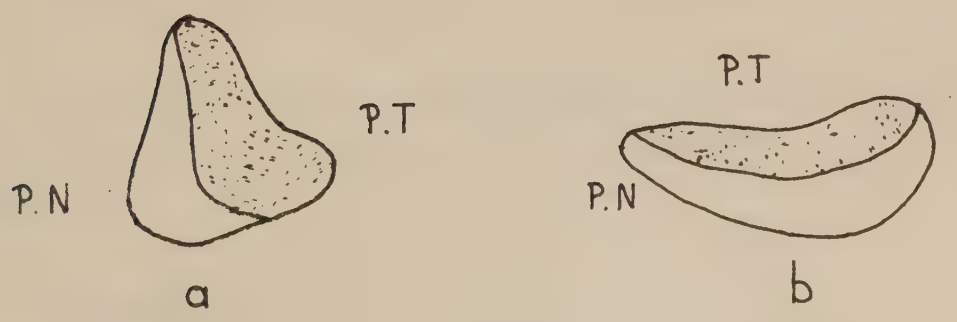


Figure 5 bis.- Muscles adducteurs de C. angulata (a) et d'O. edulis (b); partie transparente (P.T.), partie nacrée (P.N.)

La vascularisation du muscle est le fait de l'aorte postérieure qui émerge directement du ventricule et s'enfonce dans le muscle, après avoir donné naissance à une petite branche qui irrigue le rectum. Sur le muscle adducteur, dans la région pylorique, se trouve un sinus musculaire (63). Il existe une veine musculaire afférente qui se jette dans la veine afférente commune.

Le muscle adducteur est innervé par deux nerfs symétriques issus du ganglion viscéral et qui s'enfoncent immédiatement entre la partie nacrée et la partie transparente du muscle, dans la cloison conjonctive.

Le muscle adducteur est un organe qui représente, en poids,de 20 à 40 % des parties molles, suivant l'état de l'animal (63).

La partie transparente de l'adducteur, encore appelée vitreuse, hyaline ou sombre, est dite striée et rapide. C'est un tissu musculaire de type phasique.

La partie nacrée, encore appelée blanche, opaque ou opaline, est dite lisse et lente. Les Anglo-Saxons la nomment"Catch muscle" et les Allemands "Sperrmuskel". C'est un tissu musculaire de type tonique.

La première, relativement tendre, se laisse facilement couper au scalpel. Sa couleur va du gris au rose. La seconde, très ferme et fibreuse, crisse sous le scalpel et est difficile à trancher.

La partie nacrée est généralement moins importante que la partie transparente; en raison de la forme concave des valves, elle est moins épaisse.

Histologie.

La fibre musculaire

Les fibres musculaires sont noyées dans un tissu conjonctif formé de fibres grossières, de fibres très fines de collagène et de fibroblastes

généralement fusiformes, mais dont quelques-uns sont étoilés (14).

Les notions d'endomysium, d'épimysium et de périmysium sont ici valables comme dans les muscles squelettiques des vertébrés. Les fibres musculaires forment des faisceaux dont l'aspect est d'ailleurs moins prononcé dans la partie transparente que dans la partie nacrée. Le tissu conjonctif interfasciculaire est plus développé dans la partie nacrée (63).

MARCEAU (144) et BOWDEN (14) ont donné une excellente description des fibres des deux parties du muscle.

Les fibres de la partie nacrée ne s'étendent pas d'une valve à l'autre, sauf chez les toutes jeunes huîtres. Ces fibres sont de deux sortes; celles qui sont noyées dans la masse musculaire sont effilées aux deux extrémités, les autres s'insèrent aux valves par une extrémité munie de courtes digitations, tandis que l'autre extrémité est effilée. Ces fibres présentent, en coupe transversale, une section arrondie ou à peine elliptique. Elles sont multinucléées. Les noyaux, ovales, sont situés à la périphérie de la fibre. Le sarcoplasme forme une couche très mince en surface de la cellule et autour des noyaux. La majeure partie de la fibre est occupée par des fibrilles. Le sarcolemme a été mis en évidence par MARCEAU. HANSON et LOWY (81) ont parfaitement décrit cette membrane chez C. angulata : au microscope électronique, elle apparaît sous l'aspect de deux lignes denses séparées par une zone de plus faible densité. Les fibres intactes et en contraction ont, selon BOWDEN, une longueur de 2 à 3 mm et un diamètre de 12 µ.

Les fibres de la partie transparente ont des formes sensiblement identiques à celles de la partie nacrée. Elles sont cependant uninucléées et leur section transversale est nettement elliptique; leurs dimensions sont plus faibles : longueur de 1 à 2 mm et diamètre de 8 µ.

Nous avons trouvé peu de renseignements sur le réticulum endoplasmique des fibres musculaires des adducteurs des Bivalves; on observe la présence de nombreuses vésicules sur les microphotographies du muscle adducteur des Ostreidae réalisées au microscope électronique.

Les sarcosomes semblent très petits et peu nombreux dans la partie nacrée (80). Dans la partie transparente de C. angulata, ils ont 2 μ de long et 0,2 μ de diamètre et sont placés sous la membrane cellulaire (81).

La zone de rattachement du muscle à la coquille présente un aspect particulier, avec un épithélium adhésif, modification de l'épithélium palléal. Il secrète une fine couche, probablement de nature collagène (63) par laquelle les fibres musculaires se rattachent à la coquille.

Les fibrilles.

Les muscles des Invertébrés, et plus particulièrement les adducteurs des Bivalves, ont été de ce point de vue très étudiés. Le microscope photonique n'a jamais permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Le microscope électronique semble avoir élucidé le problème. Cet exemple montre combien l'évolution technologique est un facteur déterminant du progrès de la Biologie.

Les anciens zoologistes ont considéré la partie nacrée du muscle adducteur comme un ligament évitant l'ouverture excessive des valves, l'autre partie étant responsable de leur fermeture (17).

Mais, rapidement, la structure musculaire des deux parties a été reconnue, la forme générale des fibres a été décrite et leur structure fibrillaire admise.

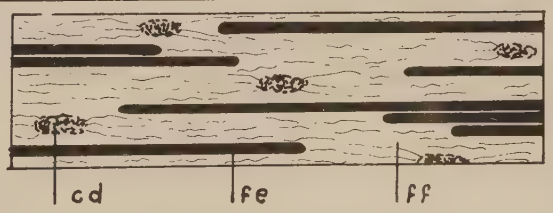
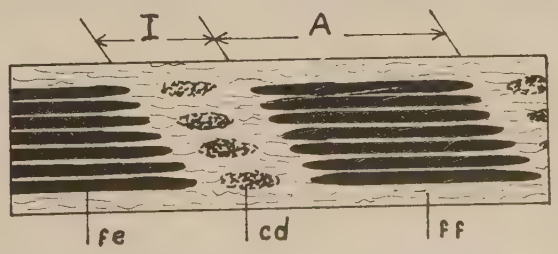
Cette structure fibrillaire impose aux muscles des aspects qui ont été diversement interprétés. Les tableaux IV et V indiquent deux classifications des fibres des muscles adducteurs des Mollusques basées sur leur structure fibrillaire. La première date de 1909 (MARCEAU - 144), la seconde a été dressée par HOYLE (98) en 1964. Entre ces deux dates, le microscope électronique est apparu et la biochimie a considérablement progressé. Nous avons situé sur les tableaux la place des parties nacrée et transparente.

Pour MARCEAU, les fibres musculaires de la partie nacrée des muscles adducteurs des huîtres contiennent des fibrilles très fines et très abondantes

TABLEAU IV

Classification de MARCEAU (1909)		
Fibres musculaires	Adducteur d'*Ostrea* et de *Crassostrea*	
I) à fibrilles parallèles à leur axe et présentant de nombreuses anastomoses entre elles.		P. nacrée
II) à fibrilles lisses enroulées en hélice.	D'après BOWDEN (14)	P.transparente
III) à fibrilles striées parallèles à leur axe (striations transversales, obliques, en chevrons ou mixtes).		

TABLEAU V

Classification de HOYLE (1964)		
Fibres musculaires	Adducteur d'*Ostrea* et de *Crassostrea*	
I) Striées ordinaires		
II) Lisses capables de contractions prolongées et montrant des caractères paramyosiniques.	 D'après TWAROG (254)	P. nacrée
III) Lisses ne montrant pas de caractères paramyosiniques.		
IV) Lisses intermédiaires		
V) Pseudo-striées	 D'après TWAROG (254)	P.transparente

par rapport au sarcoplasme. Dans un muscle contracté, elles ne sont ni rigoureusement parallèles entre elles, ni étendues sur une grande longueur, ni anastomosées latéralement. Cependant, lorsque le muscle est en extension, elles paraissent rigoureusement parallèles et s'étendre sur toute la longueur de la fibre.

Les fibres de la partie transparente des adducteurs d'huîtres possèdent des fibrilles enroulées en hélice. Vue au microscope photonique, la fibre apparaît striée doublement et obliquement; des lignes claires obliques en se chevauchant donnent des "séries de mailles losangiques sombres". L'aspect est dû, selon MARCEAU, à plusieurs systèmes de fibrilles enroulées en hélices inverses et de même pas (Tableau IV). L'entrecroisement optique des fibrilles brillantes délimite les mailles losangiques sombres. Il confirme ainsi les travaux de ENGELMANN, en 1881, sur l'anodonte (49). FOL, en 1888, pensait qu'il n'existait qu'un seul système de fibrilles enroulées en hélice : on observait simultanément les courbes des faces supérieures et inférieures (59). ROULE l'avait confirmé la même année pour Ostrea (215). Toutes ces interprétations paraissaient physiologiquement intéressantes.

BOWDEN (14), en 1958, a confirmé les conclusions de MARCEAU pour la partie nacrée d'Ostrea. Par contre, il affirme n'avoir jamais trouvé d'arrangement hélicoïdal dans les fibres de la partie transparente. Il pense que le treillis losangique est dû à des adhésions latérales entre les fibrilles.

Des travaux de microscopie électronique et de diffraction aux rayons X ont bouleversé toutes les hypothèses, comme pour la fibre striée des muscles des vertébrés.

La fibre de la partie nacrée est lisse et possède des caractères paramyosiniques; elle est capable de contractions très prolongées : c'est une fibre tonique.

Selon ELLIOTT (48) HANSON et LOWY (81)(82), la fibre de la partie nacrée de l'adducteur de C. angulata contient deux types de filaments qui ne sont pas groupés en myofibrilles :

- des filaments épais (f.e.) de section grossièrement circulaire, d'un diamètre de 200 à 1500 Å, atteignant 30 μ de long, formés par l'accolement de rubans de paramyosine de 100 à 150 μ d'épaisseur; ces rubans, déjà mis en évidence par HALL, JAKUS et SCHMITT (73) chez M. mercenaria, montrent une périodicité spécifique de 145 Å;

- des filaments fins (f.f.) d'un diamètre de 50 à 100 Å, apparaissant souvent régulièrement disposés autour du filament épais; ils sont en connexion avec des "corps denses" (c.d.).

Ces deux types de filaments sont discontinus; on observe des projections entre les filaments épais et les filaments fins. On peut penser que la contraction se produit par un glissement entre les deux types de filaments.

Il n'existe aucun arrangement régulier de ces deux types de filaments (Tableau V).

La fibre de la partie transparente du muscle adducteur des Ostreidae est dite pseudo-striée. Elle a été décrite par HANSON et LOWY (81), en 1961, chez C. angulata.

Il n'y a pas de myofibrilles différenciées et le matériel contractile remplit presque toute la fibre. Comme dans la fibre nacrée, on trouve :

- des filaments épais de 150 à 600 Å sur 4,5 μ, de type paramyosinique,
- des filaments fins d'un diamètre de 50 Å,
- des "corps denses".

En coupe transversale, on remarque chaque filament épais entouré de 12 filaments fins, du moins à certains niveaux de la fibre.

La fibre striée avec ses bandes A et I (Tableau V) est bien différente de la fibre striée transversalement des muscles squelettiques des Vertébrés. En effet,

- les bandes font un angle de 10° avec l'axe fibrillaire et sont arrangées en hélice sur le pourtour de la fibre donnant naissance à la striation double et oblique observée par MARCEAU et d'autres auteurs au microscope photonique; ces bandes se ramifient et s'anastomosent à l'intérieur de la fibre;

- il n'y a pas de ligne Z, mais des "corps denses" dans lesquels pénètrent de nombreux filaments fins.

Comme pour les fibres de la partie nacrée, on remarque des projections transversales entre les filaments épais et fins et l'on peut penser que la contraction se fait aussi par glissement des filaments l'un sur l'autre.

Cette fibre, capable de contractions phasiques, est cependant relativement tonique car, en contraction isométrique, la tension diminue de la moitié de sa valeur en un temps dix fois plus long que le temps nécessaire pour atteindre sa valeur maximum.

Déjà en 1860, MARGO (145) expliquait la striation oblique des fibres par la présence dans une substance homogène de petites granulations biréfringentes (sarcous éléments) régulièrement disposées en rangées transversales plus ou moins obliques. MARGO travaillait sur Anodonta, mais SCHWALBE (224), en 1869, confirmait ses travaux en étudiant l'huître.

Si donc, les fibres de la partie nacrée de l'adducteur des Ostreidae sont lisses, paramyosiniques et toniques, les fibres de la partie transparente sont striées ou plutôt pseudo-striées, paramyosiniques et montrent, quoique phasiques, une certaine tonicité.

Les protéines de structure et leur localisation

Il existe d'excellentes mises au point sur les protéines de structure des muscles en général et des muscles des Invertébrés en particulier : SZENT-GYORGYI (1960) (239), HANSON et LOWY (1960 et 1965) (80)(83), POGLAZOV

(1966) (185), SEIFTER et GALLOP (1966) (227).

Les renseignements obtenus par le microscope électronique, la diffraction des rayons X, l'extraction différentielle et les méthodes biochimiques permettent de penser que dans les fibres des muscles adducteurs des Ostreidae, on trouve au moins quatre protéines de structure :

- l'actine,
- la myosine,
- la tropomyosine A (insoluble dans l'eau),
- la tropomyosine B (soluble dans l'eau).

L'actine a été préparée à partir des muscles adducteurs d'Ostrea et tout laisse à penser qu'elle est située dans les filaments fins.

La tropomyosine A, qui n'a jamais été observée dans les muscles des Vertébrés, forme la partie la plus importante des protéines de structure des fibres contenant des rubans de paramyosine. Elle est le constituant probable de ces rubans de paramyosine et de ce fait des filaments épais des fibres. Chez C. virginica, la tropomyosine A représente 22 % des protéines totales de la partie nacrée et 16 % de celles de la partie transparente (63).

La tropomyosine A est dépourvue d'activité ATPasique et ne peut se combiner à l'actine; aussi divers chercheurs ont pensé qu'autour de cette tropomyosine A, il pourrait y avoir de la myosine. Les filaments épais seraient ainsi formés d'un coeur de tropomyosine A autour duquel seraient organisés des sous-filaments de myosine enzymatiquement active. La tropomyosine A serait ainsi une substance de consolidation permettant aux filaments épais de soutenir les forces de liaison actine - myosine qui peuvent alors se développer. Une protéine semblable à la myosine a effectivement été extraite des muscles adducteurs des bivalves.

La tropomyosine B est peut-être associée à l'actine comme dans les muscles squelettiques des vertébrés. Elle aurait une fonction mécanique ou contrôlerait l'activité de l'actine.

Il faut noter que la tropomyosine A, la tropomyosine B et la fraction I de la myosine (méromyosine légère) ont toutes trois un contenu élevé en hélice α, leur permettant une fonction mécanique importante.

La fonction tonique de la partie nacrée du muscle adducteur

Nous ne décrirons pas le phénomène de la contraction musculaire probablement dû à des glissements filamentaires. Nous noterons cependant qu'un phénomène contractile, s'il se situe au niveau des protéines de structure est contrôlé par l'influx nerveux, le tissu conjonctif et les protéines sarcoplasmiques qui règlent le métabolisme de la fibre musculaire.

Il nous faut cependant parler de la fonction tonique ou "catch mechanism" de la partie nacrée du muscle adducteur. Les muscles adducteurs des Mollusques maintiennent une tension extraordinaire sans utiliser beaucoup d'énergie, sans développer beaucoup de chaleur ni présenter beaucoup de fatigue (227). Comment les bivalves peuvent-ils garder leurs valves closes pendant de longues périodes et ceci contre les forces exercées par le ligament élastique ? Pour SZENT-GYORGYI (240) citant un travail de BETHE (1911), si de tels muscles demandaient pour faire ce travail autant d'énergie que les autres muscles, le corps entier de l'animal serait consumé en trois jours, rien que pour garder les valves closes !

Pour tenter d'expliquer ce phénomène, deux théories sont en présence

- l'une soutenue par JOHNSON, KAHN, SZENT-GYORGYI (114) et RUEGG (216)(217)(218),
- l'autre défendue par HANSON et LOWY (81)(82).

Les auteurs de la première théorie supposent que la tension active est développée par la composante acto-myosinique du muscle et maintenue, en l'absence du stade actif, par une altération dans l'état de la paramyosine. Celle-ci passant de la forme plastique à la forme rigide, le muscle devient plus résistant à l'étirement. Ce changement serait déclenché par des variations de pH.

Les auteurs de la seconde théorie affirment qu'il n'y a pas un système pour développer la tension et un second pour la maintenir. Contraction tonique et phasique se produisent par un phénomène de glissement de filaments avec formation de connexions acto-myosiniques. Mais, dans l'état tonique, les ruptures des connexions sont beaucoup plus lentes que dans l'état phasique. La tension est ainsi maintenue. C'est une théorie "unitaire" (227).

Notre but étant l'étude des protéines sarcoplasmiques, nous rappelons que certains chercheurs ont pensé que le sarcoplasme pouvait être doué d'une certaine contractilité, servant une fonction tonique, alors que les fibrilles étaient utilisées pour une fonction phasique : travaux de BOTTAZZI en 1897 (13) sur le coeur, repris par HOYLE (97) en 1957.

Autres particularités des parties nacrées et transparentes.

Nous avons indiqué des différences anatomiques, morphologiques, histologiques, ultrastructurales et physiologiques entre les deux parties du muscle adducteur d'*Ostrea* et de *Crassostrea*.

Nous pouvons en outre remarquer que la partie nacrée est plus éloignée de la charnière que la partie transparente, ce qui favorise la vitesse de fermeture pour la partie phasique et la puissance de maintien de la fermeture pour la partie tonique (144).

Les travaux de HOPKINS (1930) (96) font état, chez *C. virginica*, d'une variation dans le rapport poids de la partie transparente / poids de la partie nacrée suivant la zone où vivent ces huîtres. Le rapport est de 1,26 pour les huîtres qui découvrent souvent, et de 2,51 pour celles qui vivent les trois cinquièmes du temps immergées. La partie nacrée est donc plus développée chez les individus qui restent à découvert longtemps et par conséquent doivent garder leurs valves fermées.

HUMPHREY (100)(101) étudie les diverses sources d'énergie ainsi que l'activité ATPasique et glycolytique des parties nacrée et transparente

de l'adducteur de Crassostrea (Saxostrea) commercialis. Des différences importantes apparaissent dans le tableau VI où nous avons fait figurer quelques résultats.

Les travaux de BRICTEUX-GREGOIRE et coll. (15)(16), sur la régulation isosmotique intracellulaire chez O. edulis et C. angulata font apparaître des différences importantes au niveau des constituants inorganiques, des acides aminés libres, de la taurine et de la bétaïne, entre partie nacrée et partie transparente.

Tout ceci indique des différences métaboliques profondes entre les deux parties du muscle adducteur.

Différence entre O. edulis et C. angulata.

Nous avons déjà dit que le muscle adducteur, subcentral chez O.edulis est bien plus éloigné de la charnière chez C. angulata, ce qui lui donne ici un excellent moment mécanique.

YONGE (274) remarque que la partie transparente de C. angulata est notablement plus importante que celle d'O. edulis. Nous avons pu le constater sur chacune des huîtres que nous avons examinée.C. gigas possède d'ailleurs le même caractère que C. angulata.

BIERRY et coll. (11) dosant le glycogène du muscle adducteur dans son entier, trouvent 0,80 à 2 g % chez O. edulis et 0,40 à 1,50 g % chez C. angulata.

CHAPHEAU (20), étudiant les divers tissus des huîtres, dont le muscle adducteur dans son entier, affirme que les intensités respiratoires sont les mêmes pour O. edulis et C. angulata. Cependant, les tissus d'O. edulis sont plus sensibles, par exemple vis à vis de la température.

FLORKIN (56) fait remarquer que la taurine est un effecteur très important de la régulation isosmotique intracellulaire chez C. angulata, alors qu'elle ne joue aucun rôle chez O. edulis.

T A B L E A U VI

Divers facteurs énergétiques étudiés par HUMPHREY, sur les parties nacrées et transparentes de l'adducteur de C. commercialis.

	Partie nacrée	Partie transparente	Remarques
A M P	31 mg %	57 mg %	Pour des huîtres fraîchement sorties de l'eau. Après quelques jours passés hors de l'eau, l'ATP diminue et l'AMP augmente.
A T P	61 mg %	136 mg %	
Soluble dans l'eau	+	+	
ATPase Myosine	+ +	+	
Intensité de la glycolyse	0,88	4,4	Exprimée en µl d'acide par mg d'azote et par heure (Homogénat) Faible lorsque on les compare aux vertébrés mais plus importante dans la partie transparente.
Arginine phosphate	90 mg %	114 mg %	Ne varie pas de façon significative après quelques jours passés hors de l'eau.

Nous avons tenté de dresser un tableau mettant en évidence les différences entre partie nacrée et partie transparente en y faisant figurer leurs rôles, parfois différents, chez O. edulis et C. angulata. Nous nous sommes inspirés, sur ce point, des travaux de YONGE (276). (Tableau VII).

Après avoir exposé des différences et des ressemblances existant entre la partie nacrée et la partie transparente de l'adducteur ainsi qu'entre les adducteurs d'Ostrea et de Crassostrea, nous retiendrons surtout les différences. Si le rôle de la partie nacrée est le même chez Ostrea et Crassostrea, la partie transparente semble tenir un rôle plus complexe chez Crassostrea que chez Ostrea et semble mieux équipée pour le remplir.

Nous nous efforcerons dans notre travail de préciser certains aspects des protéines sarcoplasmiques de l'adducteur d'Ostrea et de Crassostrea. Nous y retrouverons sans doute des ressemblances et des différences correspondant à celles que nous venons d'énoncer.

Les méthodes d'extraction, de fractionnement et d'étude seront présentées dans le chapitre suivant.

TABLEAU VII

Partie transparente et Partie nacrée du muscle adducteur d'O.edulis et de C.angulata
(Nous n'avons pas fait figurer les différences existant aux niveaux métabolique et énergétique).

Tissu musculaire	Ultrastructure	Rôles principaux		Remarques
NACRE Fibre : multinucléée C.T. : arrondie L : 2 - 3 mm Ø : 12 µ	- Lisse - Paramyosine ++ - Filaments fins : Ø : 50 - 100 Å - Filaments épais Ø : 200-1500 Å L : 30 µ TONIQUE	Défense	La partie tonique est mécaniquement bien placée chez l'une et l'autre espèce pour lutter contre l'exondation, les températures et les salinités extrêmes, l'attaque des ennemis*	Plus le mollusque vit haut placé sur le rivage, plus la partie nacrée prend de l'importance.
TRANSPARENT Fibre : Uninucléée C.T. : elliptique L : 1 - 2 mm Ø : 8 µ	- Pseudostriée - Paramyosine + - Filaments fins Ø : 50 Å - Filaments épais Ø : 150 - 600 Å L : 4,5 µ PHASIQUE (possède cependant une certaine tonicité).	Evacuation des Pseudo-fèces Evacuation des Sédiments	C.angulata est mieux équipée à ce sujet par la position excentrée du muscle et le rapport partie transparente/partie nacrée plus grand que chez Ostrea**	C.angulata est très bien adaptée aux eaux troubles, riches en sédiments.
		Alimentation	Rôle peu important***	
		Le frai et l'essaimage	C.angulata ♂ et O.edulis ♂ : aucun rôle, car le sperme suit le courant exhalant normal et de plus est mobile.	
			C.angulata ♀ : action très importante, car les ovules, immobiles, doivent être éjectés de la chambre inhalante. Relâchements et contractions fréquentes et régulières.	C. angulata est très bien adaptée au rôle d'un animal non incubateur.
			O.edulis ♀ : éjection d'un nuage de larves par quelques contractions brutales, mais irrégulières.	

* Les huîtres possèdent d'autres moyens de défense : chambrage, dépôt crayeux, réparation de la coquille, régulation isosmotique intracellulaire ...

** C. angulata est dotée, en outre, d'une chambre promyaire que ne possède pas O. edulis.

*** Le mécanisme ciliaire joue ici un rôle primordial.

TROISIEME PARTIE

METHODES D'EXTRACTION DES PROTEINES

Notre étude porte sur les protéines des deux parties du muscle adducteur de diverses huîtres. Dans un but comparatif, nous examinerons des extraits de muscles squelettiques de carpes.

Les protéines musculaires peuvent se différencier selon plusieurs critères :

- propriétés de solubilité et d'extractibilité,
- propriétés enzymatiques,
- propriétés chimiques,
- propriétés électrochimiques,
- propriétés de masses, formes et dimensions.

Les premières propriétés à envisager sont celles de solubilité, car ce sont des propriétés en soi, permettant de classer les protéines en groupes divers et de les séparer les unes des autres; il est le plus souvent nécessaire de mettre les protéines musculaires en solution avant d'en étudier les autres propriétés.

En ce qui concerne l'extractibilité, chaque tissu musculaire pose un problème particulier, variant selon l'espèce animale et les conditions physiologiques du moment.

Nous nous attacherons à éviter les dénaturations irréversibles involontaires. Notre but principal, en effet, n'est pas d'isoler une protéine en particulier, mais de nous livrer, par des méthodes appropriées, à un fractionnement d'ensemble des extraits de muscles adducteurs.

Si parfois, il est nécessaire d'opérer une extraction aussi complète que possible des protéines, cela est inutile et même parfois gênant lors de l'analyse de l'extrait. Nous pensons surtout ici à l'augmentation trop importante d'une fraction par rapport aux autres, augmentation pouvant perturber une séparation électrophorétique.

Nous serons amenés à envisager et à discuter de l'effet perturbateur apporté par des échantillons de force ionique trop élevée sur les séparations électrophorétiques et chromatographiques.

LES GRANDES FRACTIONS PROTEIQUES MUSCULAIRES

Les quatre grandes fractions protéiques du muscle sont (239) :

- les protéines des granules,
- les protéines du stroma,
- les protéines myofibrillaires,
- les protéines sarcoplasmiques.

Pour se débarrasser des granules : noyaux, sarcosomes, microsomes, il faut recourir, après un broyage approprié, à une centrifugation, mais pour les microsomes, il faut atteindre 100.000 g (9).

Les protéines du stroma, appartenant par exemple au sarcolemme, restent dans le résidu après extraction prolongée d'un muscle bien homogénéisé à l'aide de solutions salines fortes. Certains auteurs (44) appellent protéines du stroma, celles qui ne se dissolvent pas dans les solutions salines usuelles. La tropomyosine B, par exemple, se rangerait alors parmi ces protéines.

Les protéines myofibrillaires, encore appelées "protéines de structure" ou "protéines insolubles", sont les protéines responsables de l'organisation filamenteuse du muscle. Il est nécessaire, pour les extraire, d'employer des solutions salines neutres de forces ioniques élevées ($\frac{\Gamma}{2} > 0,3$). Ce sont principalement la myosine, l'actine, la tropomyosine B et la tropomyosine A (= paramyosine). Ces protéines participent directement à la contraction musculaire.

Les protéines sarcoplasmiques, appelées encore "protéines solubles" sont celles qui feront l'objet essentiel de notre travail. Elles sont <u>directement</u> solubles dans les solutions salines neutres de faibles forces ioniques ($\frac{\Gamma}{2} < 0,2$) et représentent <u>dans une première approximation</u> toutes les protéines solubles du muscle adducteur. Elles comprennent en particulier la myoglobine et un grand nombre d'enzymes de la glycogénolyse. On doit y ajouter des protéines spéciales de faibles poids moléculaires qui ne paraissent jouer aucun rôle dans la glycogénolyse (179) et qui ne semblent exister que dans certaines classes de vertébrés inférieurs (58). Des études complémentaires démontreront peut-être un jour que ces protéines ont une localisation zoologique moins restreinte (177). Il faut noter que la présence de myoglobine n'est pas constante dans le règne animal.

Ces protéines ne contribuent pas d'une façon significative à l'organisation filamenteuse du muscle.

Parmi ces "protéines solubles", on peut distinguer quatre fractions :

- le myogène, soluble dans l'eau,
- la myoalbumine, soluble dans l'eau,
- la globuline X, insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solutions salines de faible force ionique $\frac{\Gamma}{2} \rangle 0,005$,
- et la myoglobine, soluble dans l'eau.

Myogène et globuline X sont des "mélanges" de protéines dont nous verrons l'hétérogénéité en électrophorèse par exemple.

Certains auteurs (30) nient que la globuline X et la myoalbumine soient des protéines natives. Ils pensent que ce sont des protéines dénaturées. Sous le terme myogènes, ils englobent toutes les protéines extractibles à faible force ionique. Nous ne les suivrons pas dans cette voie et conserverons les dénominations énoncées plus haut avec leurs particularités.

Nous avons indiqué que les protéines solubles dans les solutions salines de faibles forces ioniques correspondaient approximativement aux protéines sarcoplasmiques. En effet, si l'on isole les myofibrilles des muscles squelettiques du lapin, qu'on les traite par des solutions salines de faibles forces ioniques, on extrait, par exemple, de la créatinekinase électrophorétiquement et immunologiquement semblable à la créatinekinase sarcoplasmique (43). De même, l'aldolase est en partie liée à la F-actine, on ne peut la désorber complètement qu'à une force ionique supérieure à 0,2 (5).

LES PROBLEMES POSES PAR L'EXTRACTION

L'extraction des protéines sarcoplasmiques apparaît comme une opération simple si l'on en juge par le schéma du tableau VIII.

Mais, si le problème de la solution d'extraction est crucial, il n'est pas le seul. Pour effectuer de bonnes extractions, il faut pouvoir contrôler les divers points suivants :

TABLEAU VIII

Extraction des protéines sarcoplasmiques

Extraction	Dialyse	Résultat
Eau distillée	eau distillée (pour tenir compte de la force ionique propre du muscle)	- une solution de (myogène + myoalbumine + myoglobine) - un précipité
solution saline de force ionique inférieure à 0,2	solution d'extraction	- une solution de (myogène, myoalbumine, myoglobine et globuline X) - un précipité
"	eau distillée	- une solution de (myogène, myoalbumine, myoglobine) - un précipité de globuline X (que l'on peut redissoudre dans un tampon de faible force ionique)
solution saline de force ionique supérieure à 0,3		- une solution de protéines sarcoplasmiques + des protéines de structure.

- les animaux et leur prélèvement,
- le transport des animaux,
- la conservation des animaux au laboratoire,
- le prélèvement des muscles,
- l'extraction proprement dite,
    - choix du tampon : sels choisis, pH, force ionique, température, volume par rapport au poids de muscle,
    - choix du broyeur,
    - extraction : durée, température, agitation ou non, unique ou répétée,
    - centrifugations,
    - dialyse,
- la conservation des extraits,
- la détermination de la teneur en protéines des extraits.

A N A L Y S E D E S P R I N C I P A U X T R A V A U X

Dans une étude préalable des publications relatives à l'extraction des protéines solubles dans des solutions salines de faibles forces ioniques, nous avons retenu plus particulièrement les auteurs qui se sont livrés, après extraction, à un fractionnement d'ensemble des protéines.

Dans le tableau IX, qui n'a pas la prétention d'être exhaustif, nous précisons, pour les animaux étudiés, les muscles prélevés, la méthode d'homogénéisation, les tampons choisis (seuls ceux de faible force ionique ont été relevés) et les méthodes analytiques principales.

Les travaux se rapportant aux muscles squelettiques des vertébrés sont les plus nombreux. Cependant, quelques auteurs se sont intéressés aux muscles d'invertébrés.

On est frappé par la diversité des protocoles expérimentaux.

Les animaux sont le plus généralement gardés dans leur milieu naturel jusqu'au moment des prélèvements. Cependant, des impératifs géographi-

TABLEAU IX

Analyse des principaux travaux.

Animal	Muscle	Homogénéisation	Tampon	Méthode d'analyse	Auteur
VERTEBRES					
POISSONS					
Anchois de Méditerranée	+	Mortier + sable	P + KCl ou P + NaCl μ 0,075 à 0,173 pH 7 à 7,8	E. P	Aparicio Ruiz (D) 1963 (4)
Carpe	blanc	Congelé à 0°C et subdivisé	T.P. : μ 0,15 ; pH 7,5 T.P. + KCl : μ 0,25	E. P	Bistocchi (M) (12) 1961
Morue	total	Broyé à 0°C	T.P. : μ 0,05 - 0,1 - 0,2 pH 7,5	E. F	Connell (J.J.)(27) 1953
Divers	total	Broyé à 0°C	T.P. : μ 0,05 ; pH 7,5	E. F	Connell (J.J.)(28) 1953
Morue	total	Broyé à 0°C	T.P. : μ 0,05-0,1-0,2	U. C	Connell (J.J.)(29) 1958
Carpe	blanc rouge	M. C.	E.D. T.P. : μ 0,15 ; pH 7,7	E.F. et U.C.	Hamoir (G) (76) 1955
Carpe	blanc rouge	Broyeur domestique	E. D.	E.F. et U.C.	Hamoir (G) (79) Konosu (S) 1965
Carpe Plie	blanc	Machine à viande ou M. C.	E. D.	E.F. et U.C.	Henrotte (J.G.)(89) 1960
Cyprinodontiformes	total	Latapie	T.P. + Sterox SS	E. P.	Hewitt (R.E.) (91) Word (L.W.) et coll. 1963
Perches d'Amériques	Près de la nageoire dorsale	waring blender	T.P. : μ 0,10 ; pH 7,5	E. P.	Lillevik (H.A.) Schloemer (C.L.) 1961 (136)
Divers	Filet	+	E. D.	D. E.	Mancuso(V.M.)(142) 1964
Divers	Filet	Hachoir à viande puis broyage avec du sable.	T.P. : μ 0,05 ; pH 7,5	E.P. et E.F.	Nikkilä(O.E.)(171) Linko (R.R.) 1955
Carpe	blanc rouge	Broyeur domestique ou M. C.	Saccharose 0,3M + triethyl amine 10mM + EDTA-Na2 3mM pH 7 - 7,4	C. G. et Enzymologie	Pechère(J.F.)(179) Focant (B) 1965
Saumons et divers	+	Fragmenter et waring blender	T.P. : μ 0,05 ; pH 7,5	DEAE - cell. DEAE - Seph. E.F., E.G.A.,D.E.	Tsuyuki (H) (248) Roberts (E) (240) et coll. (253) 1961-1962-1965
BATRACIENS					
Grenouille rieuse	Gastrocnémien Estomac	Congelé dans N2 liquide et broyé au mortier.	Tris-HCl 0,02M + NaCl 0,05M pH 7,55	DEAE - cell. E.G.A.	Serban (M) (229) Tanasescu (D) 1963
Grenouille rieuse	Gastrocnémien	Congelé dans N2 liquide et broyé au mortier.	Tris 0,005 M pH 7,6	DEAE - cell. CM - cell. Seph. G-100 E.G.A.	Serban (M) (228) 1965

Animal	Muscle	Homogénéisation	Tampon	Méthode d'analyse	Auteur
Grenouille rieuse	Gastrocnémien	Congelé dans N2 liquide et broyé au mortier	Saccharose 0,3M + EDTA-Na2 3,0mM ds T.Tris-Hcl de pH 7,2 (0,04M)	DEAE - Seph Spectrophotométrie	Tanasescu(D)(241) 1967
OISEAUX					
Divers	Squelettique Cardiaque Gésier	Broyage sous toluène + CO_2	T. Borate d'électrophorèse selon Smithies, dilué	E.G.A.	Baker (C.M.A.)(8) 1966
Poulets	Pectoral	Mortier + sable	Très divers	E.G.A.	Neelin(J.M.)(167) 1963
Poulets	Pectoral	Mortier + sable	T. véronal sodique μ 0,05 ; pH 8	E.G.A. (Discontinue)	Neelin(J.M.)(168) 1964
Poulets	+	Mortier + sable Broyeur en verre "Dounce"	T. véronal μ 0,05;pH 8 ou eau:Myogène Saccharose 0,44M: Prot. Sarcoplasm	E.G.A. Enzymologie	Neelin(J.M.)(169) Ecobichon (D.J.) 1966
MAMMIFERES					
Porc	Transverse abdominal Gracile	Omni mixer "Servall"	T. Tris : pH 7,65	E.G.A.	Charpentier(J)(21) Goutefongea (R) 1963
Porc	+	+	E. D.	E.G.A.	Charpentier(J)(22) Goutefongea (R) 1964
Rat	Squelettique Utérin	"Ultra-turrax"	Solution isotonique de NaCl	D. E.	Formanek(von K) Kaschnitz (R) et coll. (60) 1967
Divers	Viande de Boucherie	Top - drive "Atomix" macérator	T.P. : 0,04 M ; pH 7,4	E. G. A.	Giles (B.G.)(65) 1962
Homme Lapin	Atrophié Non atrophié	Sable après refroidissement	T.P. + KCl 0,05 M μ 0,13 ; pH 7,15	E. F.	Haan (A.M.F.H.) (72) 1953
Lapin	Dorsaux Pattes (adulte et foetus)	Refroidi, fragmenté, puis waring blender	T.Tris - HCl 20 mM + KCl 0,05 M pH 7,6	DEAE - Cell. E. G. A. Enzymologie	Hartshorne (D.J.) Perry (S.V.) (85) 1962
Lapin	Cuisse	M. C.	T.P. 0,03 M μ 0,08 ; pH 7,4	Détermination quantitative	Helander(E) (87) 1957
Homme	Biopsie	Potter	T.P. : μ 0,07 ; pH 7,7	E. G. A. Enzymologie	Hughes(B.P.)(99) 1961
Lapin	Strié	Latapie	T.P. : μ 0,15 ; pH 7,7	E. F.	Jacob(J.J.C.)(107) 1947
Paresseux	Rouge (uniformément)	Moulin à viande ou M. C.	T.P. + NaCl μ 0,15 ; pH 7,3	E. F.	Jammaers (C) (110) 1963
Lapin	+	+	T. glycocollate 0,0035 M ; pH 9,5	DEAE - Cell.	Marcaud (L) (143) 1960
Bovin	Squelettique Cardiaque	omnimixer " Servall"	Sol. physiologique ou T.P.; T.veronal; T.borate μ 0,07-0,15 ; pH 7-9,2	E. P. E. F. E. G. A.	Santamaria(R)(220) et coll. (221) 1962 - 1963

Animal	Muscle	Homogénéisation	Tampon	Méthode d'analyse	Auteur
Souris	Squelettique (dystrophie ou non)	Microlatapie	T. Tris - citrique μ 0,075 ; pH 8,6	E. G. A.	Schapira(G)(222) Dreyfus (J.C.) 1958
Boeuf	+ (en rigor mortis)	+	E. D.	E. G. A.	Scopes(R.K.)(225) 1964
INVERTEBRES					
ANNELIDES					
Lombric	Tube musculo-cutané	M. C.	T.P. : μ 0,10 - 0,15 pH 7,3 - 7,6	E. F.	Godeaux (J) (66) 1954
Eisenia foetida	à différents niveaux	+	E. D.	D.E.	Moment(G.B.)(152)
MOLLUSQUES					
Escargot Gastéropode amphibie	pédieux	Microhomogénéiseur "Servall" ou Pilon + grains de silicone.	Solution de Carriker	D. E.	Davis (G.M.) (34) Lindsay (G.K.) 1967
Murex	pédieux	Latapie	T.P. : μ 0,15 ; pH 7,3	E. F.	Dubuisson(M) (46) Roubert (L) 1947
Lamellibranches divers	adducteur	Ultra - turrax	T.P. : μ 0,05 ; pH 7,5	D. E.	Moré (P) (155) Moré (M.T.) et coll. 1966
Huître portugaise	adducteur	Ultra - turrax	T.P. : μ 0,05 ; pH 7,5	C.C.M. Seph.	Moré (P) (156) Moré (M.T.) et coll. 1968
Eulamellibranches divers	adducteur pédieux siphon	+	T.Bicine : μ 0,005; pH 8,0 + E.D.T.A. Na_2	C. Seph. G-100 E. G. A. (Arginine kinase)	Moreland(B)(158) Watts (D.C.) 1967
CRUSTACES					
Homard	abdominaux	M. C.	E. D. ou T.P.:μ 0,15; pH 6,3-7,5	E. F.	Dubuisson-Brouha (A) (47) 1953
Homard	abdominaux pinces	M. C.	E. D. ou T.P. : μ 0,15 ; pH 7,3	E. F. U. C.	Jammaers(C) (109) 1960
INSECTES					
Hyménoptères	thoraciques	Potter	Saccharose 0,25 M	D. E.	Johnson(O.W.)(115) Stephen (W.P.) 1964
Divers	+	Potter	E. D.	E. P.	Stamm (M.D.)(236) 1964

Animal	Muscle	Homogénéisation	Tampon	Méthode d'analyse	Auteur
ECHINODERMES					
Divers	Divers	+	Glycylglycine + KCl + EDTA + NaOH μ 0,08 ; pH 7,6	C. Seph. G-100 (phosphagène kinase)	Moreland(B)(157) Watts (D.C.) et coll. 1967
VERTEBRES ET INVERTEBRES					
Divers	divers	Moulin à viande ou M. C.	Saccharose 0,3M) triethylamine 10mM)pH 7-7,4 EDTA - Na_2 3mM)	C. G. U. C.	Focant (B) (58) Pechère (J.F.) 1965
Grenouille, Pigeon, etc ..	divers	+	T.P. : μ 0,1 ; pH 7,8	Electrophorèse en gel d'agar	Kadykov(V.V.)(120) Yurev(V.A.)et coll. 1965
Poisson, Boeuf, Porc.	divers	+	E. D.	D. E.	Payne (W.R.) Jr (176) 1963
Lapin, Poule, Tortue,etc ..	divers	M. C.	T.P. : μ 0,15 ; pH 7,3	E. F.	Renard (S) (211) 1952
Lapin,Kangourou, Tortue,Ecrevisse etc ...	divers	+	Glycerol(2% V/V) EDTA 2 mM pH 8,7 Tris 10 mM (rajustement éventuel du pH à 7 ± 0,3)	E. G. A. Enzymologie	Scopes(R.K.)(226) 1968

Abréviations employées

C. : Colonne
C.C.M. : Chromatographie en couche mince
Cell : Cellulose
C.G. : Chromatographie sur gel
D.E. : Disc électrophorèse
E.D. : Eau distillée
E.F. : Electrophorèse de Frontières
E.G.A. : Electrophorèse en gel d'amidon
E.P. : Electrophorèse sur papier
M.C. : Microtome à congélation
P. : Phosphate
Seph. : Sephadex
T. : Tampon
U.C. : Ultracentrifugation
μ : Force ionique

ques ont obligé parfois les auteurs à travailler sur des organes ou même des animaux entiers congelés ou conservés dans de la glace.

Les méthodes de prélèvement ont varié avec l'animal. Les auteurs ont insisté sur les difficultés rencontrées avec les animaux de petite taille, où il est difficile d'éviter la souillure d'un tissu par un autre. Le sang est souvent une cause de pollution. Pour s'en débarrasser, il est parfois nécessaire de perfuser les muscles à l'aide de solutions physiologiques ou encore de plonger les muscles dans de l'eau glacée pour amener la constriction des vaisseaux.

Les tampons d'extraction sont de types divers. Pour les 46 publications étudiées, les solutions d'extraction ont été les suivantes :

- 24 Tampons phosphates avec ou non adjonction de sels neutres,
- 13 Eau distillée,
- 7 Tampons Tris-HCl ou Tris-citrique,
- 4 Tampons Veronal,
- 4 Tampons de Czock et Bucher plus ou moins modifiés,
- 2 Tampons borate,
- 2 Solutions de saccharose,
- 2 Solutions isotoniques de chlorure de sodium,
- 1 Tampon cacodylate
- 1 Tampon glycocolle,
- 1 Tampon glycyl-glycine (+EDTA),
- 1 Tampon bicine (+ EDTA),
- 1 Solution de phosphates,
- 1 Solution de Carriker.

Plusieurs auteurs ont employé des milieux non tamponnés : eau distillée, solutions de sels neutres ou de saccharose. Il nous semble qu'il est aléatoire de ne pas pouvoir contrôler le pH de l'extraction.

On trouve de l'EDTA dans 6 des tampons d'extraction, sur lesquels 4 sont employés dans des protocoles à but enzymatique.

Les pH des tampons sont en grande majorité aux environs de 7,5, très rarement au-dessous de 7 et au-dessus de 8.

Les forces ioniques les plus courantes sont : 0,05 - 0,075 - 0,1 - 0,15. Elles sont rarement inférieures à 0,05 (sauf évidemment l'eau distillée). Quelques-unes atteignent 0,20 - 0,25.

Les moyens de broyage ont été multiples : broyeurs de laboratoire de marques diverses, broyeurs domestiques, mortier avec du sable, congélation de fragments musculaires à l'azote liquide suivi d'un traitement au mortier, appareil de Potter, ultra-Turrax et microtome à congélation.

L'extraction a été réalisée le plus souvent sous agitation. Les réextractions sont rares. Les températures d'extraction vont de la température ambiante à 0°C, les volumes de solution d'extraction de 0,8 volume à 9 volumes par unité de poids de muscle frais et les durées d'extraction de 15 minutes à 2 jours.

Les centrifugations s'opèrent généralement à froid entre 500 g et 100.000 g.

L'extraction est, sauf exception, suivie d'une dialyse. A la faible force ionique de certains tampons vient s'ajouter la force ionique propre du tissu musculaire. Celle-ci est par exemple de 0,25 pour le muscle de la grenouille (45). Aussi faut-il dialyser si l'on veut se retrouver dans des conditions reproductibles.

On peut en outre extraire à une force ionique donnée, puis dialyser contre un tampon de force ionique plus faible. On obtient alors un précipité que l'on peut redissoudre dans un tampon approprié, et analyser.

Il est, de plus, bien souvent nécessaire de dialyser lorsque l'on veut faire des analyses électrophorétiques ou chromatographiques. Ceci est essentiel en électrophorèse de frontières ou en chromatographie sur échangeurs d'ions. On dialyse alors contre le tampon d'électrophorèse ou le tampon d'équilibration de la colonne chromatographique.

Les dialyses durent en moyenne 48 heures, aux environs de 0° C. L'usage de boyaux de cellulose est quasi général.

La détermination de la teneur en protéines a fait appel au biuret, à la méthode de LOWRY, à la spectrophotométrie U.V. à 280 mμ et à la réfractométrie à l'aide du réfractomètre à immersion.

De nombreux auteurs ont utilisé les extraits immédiatement après leur confection. C'est la méthode de choix, mais elle n'est pas toujours possible. Certains ont conservé les extraits deux à trois jours au réfrigérateur (0°C), d'autres trois ou quatre mois au congélateur (-25°C à -30°C) sans observer de modification. D'autres enfin ont préféré la lyophilisation.

Parmi les méthodes analytiques, l'électrophorèse est très employée; l'électrophorèse de frontières est de plus en plus remplacée par l'électrophorèse de zones, tout particulièrement dans les milieux gélifiés. Il ne faut cependant pas méconnaître l'intérêt de la méthode de TISELIUS qui permet de bonnes séparations ainsi que la mesure précise des mobilités électrophorétiques. L'ultracentrifugation analytique, technique extrêmement fine, est parfois relayée (dans une certaine mesure) par la chromatographie d'exclusion-diffusion d'un emploi fort commode. Enfin, la chromatographie sur celluloses ou Sephadex échangeurs d'ions permet aussi de bonnes séparations.

Quant aux buts poursuivis par les auteurs, ils ont été le plus souvent, du moins dans un premier temps, fondamentaux : taxonomiques, physiologiques, biochimiques, embryologiques. Mais, les applications de leurs travaux sont nombreuses : en médecine humaine et vétérinaire, dans l'industrie alimentaire, pour la mise au point éventuelle de régimes diététiques, pour le contrôle des fraudes, etc ... Nous citerons même une application à l'identification des oiseaux gênant la circulation aérienne ("bird strike" of aircraft).

NOS METHODES D'EXTRACTION

Après une étude critique expérimentale, nous avons retenu un protocole d'extraction qui n'est sans doute pas parfait mais qui, compte tenu de la matière étudiée et de la nécessité de multiplier le nombre des déterminations, nous a donné satisfaction.

Les animaux

Nous avons analysé environ 2.500 huîtres de provenances diverses mais bien déterminées; les numéros indiquent la "taille" commerciale (Tableau X).

Un grand nombre des huîtres analysées provient du Croisic. Nous avons, en novembre 1966, stocké, en caisses ostréophiles, dans un bassin de décantation, 500 O.edulis et 500 C.angulata. Le naissain provenait des Charentes.

Le lot d'huîtres de Cancale a été dragué au large, sur un banc naturel.

Les huîtres japonaises (C.gigas), sont nées au Japon au début d'Avril 1967. Elles ont été élevées dans un parc de la Tremblade. Elles avaient 10 mois au moment de la fabrication de nos extraits. Leurs poids unitaires s'étalaient cependant de 35 grammes à 60 grammes.

Transport et stockage éventuel au laboratoire

Les huîtres sont généralement prélevées la veille du jour de la fabrication des extraits. Elles sont lavées à l'eau de mer, transportées recouvertes de goëmon et entreposées pendant la nuit à + 15° C en salle conditionnée.

Parfois, dans l'impossibilité de confectionner immédiatement les extraits, nous les avons réimmergées pendant un à deux jours en aquarium

TABLEAU X

Provenances des animaux étudiés

Animaux	Origine	Remarques
O. edulis L.	Le Croisic (Loire-Atlantique)	n° 3 et n° 4
	Riec-sur-Belon (Sud-Finistère)	n° 3
	Carantec (Nord-Finistère)	n° 4
	Cancale (Ille-et-Vilaine)	n°000 (H."Sauvages")
C. angulata Lmk	Le Croisic (Loire-Atlantique)	n° 3 et n° 4
	Beauvoir (Vendée)	
	Marennes (Charente-Maritime)	n° 2
C. gigas Th.	Japon (via La Tremblade)	Age : 10 mois
Cyprinus carpio L.	Nantes (Loire-Atlantique)	Poids : 650 g

Relation entre n° et poids moyen d'une huître, en grammes

N°	O. edulis	C. angulata
000	> 120	
00	100 - 120	
0	80 - 100	
1	70 - 80	> 105
2	60 - 70	80 - 105
3	50 - 60	60 - 80
4	40 - 50	50 - 60
5	30 - 40	40 - 50

d'eau de mer (*).

Nous avons été amenés à garder trois et quatre mois, en hiver, au printemps et en été, certains lots d'huîtres en aquarium pour étudier leur devenir sous jeûne complet. L'aquarium contenait de l'eau de mer naturelle provenant, le plus généralement, du lieu de prélèvement des huîtres.

Nous avons enfin gardé des huîtres à sec, pour tenter de suivre certaines variations dues à leur vie en anaérobiose, soit à + 15° C pendant une semaine, soit à la chambre froide à + 4° C pendant un mois et demi. Les huîtres sont disposées à plat dans un récipient fermé contenant un petit cristallisoir rempli d'eau, ceci afin de conserver une atmosphère humide, évitant ainsi la mort par dessication.

Prélèvement des muscles

Certains auteurs préconisent l'anesthésie avant le prélèvement d'organes ou de tissus. Désirant éviter d'éventuelles réactions secondaires du produit anesthésiant sur les protéines sarcoplasmiques, nous n'avons pas retenu cette méthode.

Par contre, nous avons pris toute précaution afin de ne pas étirer ni léser le muscle adducteur, lors de l'ouverture des mollusques. Tenant l'huître horizontalement de la main gauche, nous sectionnons le ligament à l'aide d'un fort couteau. Celui-ci doit rester parallèle à la valve supérieure du mollusque et il faut éviter tout mouvement tendant à écarter les deux valves. Nous insérons ensuite une lame souple et très tranchante entre les valves et en suivant le mieux possible la paroi interne de la valve droite (valve plate), nous sectionnons le muscle. On peut alors enlever la valve droite et l'animal reste dans la valve gauche.

La vitalité du mollusque est contrôlée par l'examen de la rétractilité des bords du manteau; nous vérifions également les pulsations du

---

(*) Gunther Eheim ing., 7301 Deizisau/Esslingen A.N. Germany.

coeur (118). Les huîtres mortes sont écartées ainsi que celles présentant une odeur désagréable ou manquant de liquide intervalvaire. D'autres méthodes permettent de se rendre compte de la fraîcheur d'une huître, telle celle de MOCHINAGA et TAGUCHI qui testent sur un fragment de branchie, à l'aide de chlorure de 2, 3, 5-triphenyltetrazolium, la déshydrogénase de l'acide succinique (151).

D'autres observations nous ont aussi amenés à rejeter certaines huîtres ; maladie du "pied", points jaunâtres sur la partie transparente ou la partie nacrée du muscle adducteur, présence d'éponges perforantes, gros défauts de la coquille, chambrage trop important ...

Il nous est arrivé (très rarement) d'avoir des doutes dans la détermination d'O.edulis et de C.angulata. Nous avons levé l'incertitude par l'observation de la présence ou de l'absence de la chambre promyale et des denticules marginaux. Entre C.angulata et C.gigas, les doutes sont très difficiles sinon impossibles à lever.

Le prélèvement du muscle adducteur se fait en tenant compte des caractères anatomiques que nous avons exposés précédemment.

Tous les organes sont enlevés, à l'exception du muscle adducteur qui adhère à la valve gauche (valve creuse) que l'on débarrasse soigneusement du conjonctif "d'emballage" et du gros ganglion nerveux viscéral. On le libère ensuite de la valve gauche. La masse musculaire n'est cependant pas absolument exempte de quelques éléments étrangers qu'il est très difficile d'éviter.

- vaisseaux sanguins,
- nerfs,
- tissu conjonctif séparant les deux parties musculaires,
- sang et éléments figurés,
- épithélium adhésif.

Pour prélever séparément partie nacrée et partie transparente, nous sectionnons chaque zone en deçà de la cloison conjonctive de séparation. La

section est faite alors que le muscle est encore attaché à la valve gauche. La partie nacrée est prélevée en premier. On se débarrasse ensuite de la partie intermédiaire : (fragment de partie transparente + cloison conjonctive + fragment de partie nacrée). La partie transparente est prélevée en dernier.

Nous avons ainsi une "perte" sur les poids des tissus musculaires, mais il importe d'éviter une trop grande souillure des parties transparentes par les parties nacrées et inversement. A titre d'exemple, nous citerons l'importance des prélèvements et des pertes subies : pour 38 C. gigas d'un poids moyen de 38 g, nous avons obtenu 9,25 g de muscle complet, tandis que pour 54 C. gigas d'un poids moyen de 44 g, nous n'avons retenu que 8 g de partie transparente et 4 g de partie nacrée, au total 12 g de muscle, soit une perte manifeste.

Le coeur a été prélevé en coupant aux ciseaux fins l'aorte et les veines afférentes, cela après avoir déchiré avec une pince fine le tissu péricardique. Mais, le plus souvent, nous ne prélevons que le ventricule en sectionnant les jonctions auriculo-ventriculaires et en rejetant les oreillettes qui sont recouvertes par les organes de Keber de couleur brune, organes, en fait, localisés sur la paroi péricardique réfléchie sur les oreillettes (61).

Dans un but comparatif, nous avons prélevé des muscles squelettiques de carpe, Cyprinus carpio L. L'animal assommé est décapité et la peau arrachée. Les prélèvements sont réalisés sur les parties dorso-abdominales et dorso-caudales (figure 6), en séparant les muscles blancs des muscles rouges. Cela est difficile, car il n'existe pas de séparation nette entre les deux types de muscle et nous ne pouvons baser notre opération que sur la couleur des tissus (76). Nous avons conservé le muscle blanc.

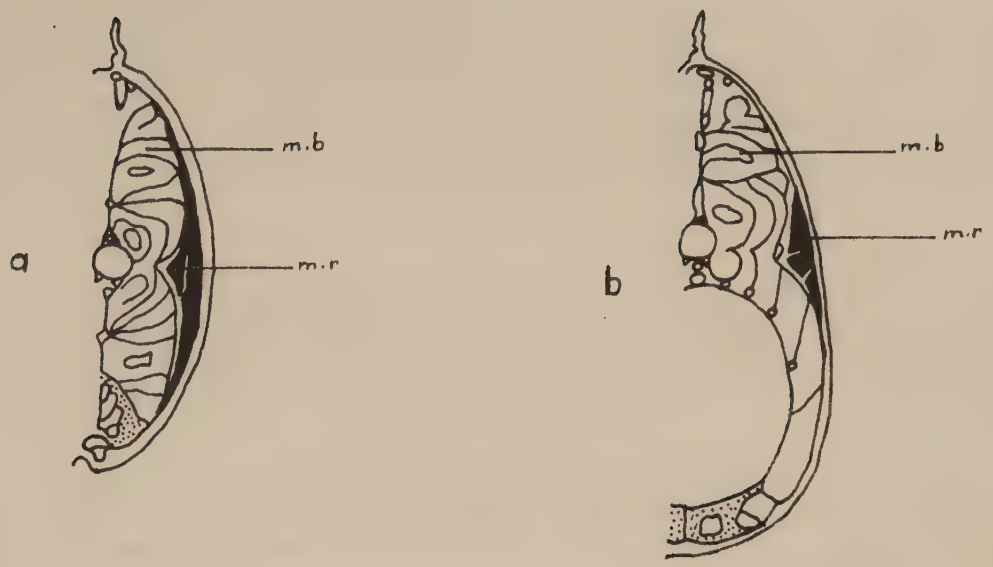


Figure 6.- Coupes transversales de la carpe aux niveaux caudal (a) et abdominal (b). Muscles blancs (m.b.) et muscles rouges (m.r.). (D'après HAMOIR - 76)

Homogénéisation

Les muscles ou parties de muscles prélevés sont rapidement lavés à l'aide du tampon d'extraction, séchés au papier-filtre, coupés en petits fragments et jetés dans des tubes de verre plongeant dans de la glace fondante.

Un homogénat peut se définir comme "la préparation d'un tissu entier dans lequel la rupture cellulaire est aussi complète que possible, tandis que la destruction des noyaux, mitochondries et autres particules est maintenue aussi faible que possible, compte tenu de nos connaissances actuelles" (191).

Il s'est donc posé pour nous un problème de broyeur, et de plus, comme notre propos était d'extraire des protéines solubles dans des solutions salines de faible force ionique, un problème de choix des solutions d'extraction.

Le microtome à congélation, employé par l'école Belge semble une méthode de choix. La longueur des fibres musculaires des Ostreidae, située entre 1 mm et 3 mm, autorise des coupes assez épaisses. Mais, la lenteur de la manipulation et la perte inévitable de tissu nous ont fait écarter cette méthode.

L'appareil de POTTER ne nous a pas donné de résultat convenable en raison, semble-t-il, de la structure particulièrement fibreuse des muscles adducteurs.

Nous avons tenté d'appliquer la méthode qui consiste à plonger les fragments tissulaires dans l'azote liquide (-193°C), et à les broyer ensuite au mortier, méthode préférentielle de divers chercheurs Roumains (229). Les fragments de muscles adducteurs sont placés dans un petit bécher et immergés dans l'azote liquide. Nous les y avons laissés soit jusqu'à cessation du bouillonnement (ce qui demande quelques secondes), soit jusqu'à cessation du dégagement des petites bulles provenant des muscles (quelques minutes), soit plus longtemps encore. A leur sortie de l'azote liquide, les muscles sont extrêmement durs et il est très difficile, sinon impossible, de les broyer au mortier. Mais, rapidement, on assiste à une décongélation partielle et l'on peut obtenir alors une pulpe inhomogène. Les parties transparentes congelées se fragmentent au broyage en groupes de filaments. Nous avons remarqué que les parties nacrées des muscles adducteurs d'huîtres flottent lorsqu'on les jette dans l'azote liquide, puis ensuite s'y enfoncent, alors que les muscles adducteurs totaux et les parties transparentes s'y enfoncent immédiatement.

Devant les difficultés rencontrées, nous nous sommes ralliés à l'Ultra-Turrax (*) dont le générateur a un diamètre de 1,8 cm, moyen d'homogénéisation plus puissant. Nous avons suivi une technique simple : Dans un tube de Pyrex très épais, de diamètre 2,5 cm et de hauteur 9,5 cm, nous plaçons un poids maximum de 4 grammes de muscle et un poids équivalent de solu-

---

(*) Janke et Kunkel, KG/Staufen I.BR - Germany.

tion d'extraction. Après cinq coups brefs et espacés d'Ultra-Turrax TP 18/2 tournant à 20.000 t/mn, nous obtenons une pâte très homogène. Nous y ajoutons deux parties en poids de solution d'extraction. Nous versons dans un Erlenmeyer à large col bouché polyéthylène et mettons à agiter pendant 2 h 30.

Nous avons donc un mélange en poids de :

1 partie de muscle + 3 parties de solution d'extraction.

Nous avions essayé au préalable plusieurs rapports; l'expérience nous a montré le bien fondé du rapport 1 : 3 (P/P) dans notre cas particulier.

Les homogénats se plastifient au cours de l'agitation; cependant, les homogénats de parties nacrées restent toujours beaucoup plus épais que ceux de parties transparentes. Nous n'avons pu empêcher une certaine émulsion air/broyat musculaire, ce qui a pu évidemment amener certaines dénaturations incontrôlées.

Toutes ces manipulations se font à la chambre froide à + 3° C.

Les solutions d'extraction

Nous n'avons pas employé l'eau distillée comme solvant, car nous désirions extraire l'ensemble des protéines sarcoplasmiques et non le myogène seul, et nous tenions à avoir un certain pouvoir tampon.

Nous avons écarté, malgré leur excellent pouvoir tampon, même aux faibles forces ioniques, les tampons à base de TRIS, qui conviennent mieux pour des études enzymatiques, car les tampons phosphates sont souvent des dépresseurs de l'activité enzymatique (30). Le TRIS est d'ailleurs loin d'être inerte de ce point de vue (MAHLER - 140 et DAYAN - 35).

Nous avons essayé comme solution d'extraction le tampon phosphate de force ionique relativement faible et de pH voisin de la neutralité, employé le plus souvent par CONNELL (27).

$Na_2 HPO_4$	-	0,0156 M	$\frac{\Gamma}{2}$	=	0,05
$K H_2 PO_4$	-	0,0035 M	pH	=	7,5

Ce tampon nous a donné toute satisfaction. Il est constitué de sels que l'on trouve avec une pureté excellente. Ce qui n'est pas le cas pour $Na H_2 PO_4$.

Il nous a paru cependant nécessaire d'étudier d'autres tampons de forces ioniques plus élevées.

Nous avions en effet remarqué la faible teneur protéique de nos extraits d'une part, les extraits de partie nacrée sont toujours moins riches que ceux de partie transparente et les extraits d'Ostrea sont toujours moins concentrés que ceux de Crassostrea. Une augmentation de la force ionique d'extraction devait normalement nous permettre d'augmenter la concentration de nos extraits.

Quelques travaux nous ont guidés dans le choix d'autres forces ioniques :

- JACOB (107) extrait les protéines sarcoplasmiques du muscle squelettique du lapin avec un tampon phosphate $\mu = 0,15$, pH 7,7; avec un tampon de force ionique 0,35, il apparaît un nouveau pic très étroit de "Myosine" sur le diagramme d'électrophorèse de frontières;

- DUBUISSON et ROUBERT (46) extraient les protéines sarcoplasmiques du muscle pédieux de Murex avec un tampon phosphate $\mu = 0,15$, pH 7,3. A $\mu = 0,40$ apparaît un pic étroit en électrophorèse de frontières;

- CONNELL (27) extrait les protéines sarcoplasmiques des muscles de poissons à l'aide de tampons phosphates de pH 7,5 et de forces ioniques 0,05 - 0,1 - 0,2; les diagrammes d'électrophorèse de frontières les meilleurs sont obtenus à $\mu = 0,05$, cependant que le tampon de force ionique 0,2 extrait plus de protéines; les protéines de structure apparaissent avec un tampon phosphate de force ionique 0,3, mais l'actomyosine peut déjà s'extraire à $\mu = 0,1$, pH 7,5, lorsque le muscle est très frais; cette actomyosine devient

très rapidement insoluble (29);

- HAMOIR (76), dans son important travail sur les protéines musculaires de la carpe, utilise pour l'extraction des protéines sarcoplasmiques l'eau distillée ou un tampon phosphate identique à celui de Jacob; pour les protéines de structure, il passe à des forces ioniques très élevées 0,5 et 1;

- HELANDER (87) a étudié la meilleure façon d'extraire les protéines du muscle de lapin d'une façon exhaustive, en faisant varier tous les paramètres; il a choisi pour les protéines sarcoplasmiques un tampon phosphate de force ionique 0,08 et de pH 7,4 et pour obtenir une extraction totale, il emploie un tampon phosphate + IK de force ionique 1,3;

- BAILEY (6) a travaillé sur les protéines du muscle adducteur de l'huître et de ceux de Pinna nobilis; les protéines solubles dans l'eau sont en quantité très faible, indiquant que 70 à 80 % du muscle est fibrillaire; il apparaît y avoir à toutes les forces ioniques des différences significatives entre la partie nacrée et la partie transparente du muscle adducteur.

Le tableau XI indique les teneurs en protéines solubles dans l'eau.

La figure 7, établie d'après les données de BAILEY (6), montre la solubilité des protéines de l'adducteur de l'huître en fonction de la force ionique; la différence d'extractibilité que nous avons nous-mêmes remarquée entre les deux parties du muscle adducteur apparaît ici clairement ainsi qu'une augmentation très significative entre les forces ioniques 0,20 et 0,30.

Ces études et diverses expériences nous ont conduit à faire un choix du pH et de la force ionique de nos tampons : Nous utiliserons essentiellement le tampon phosphate de force ionique 0,05 et de pH 7,5. Nous essaierons en outre les forces ioniques : 0,15 - 0,25 - 0,35; celle de 0,35 est une limite supérieure qui apportera des protéines de structure. Sans changer le tampon proprement dit, pour faire monter la force ionique, nous ajouterons du KCl.

TABLEAU XI

Teneurs en protéines solubles dans l'eau.

	Adducteur d'Huître		M.squelettique de Lapin
	P.nacrée	P.transparente	
Protéines solubles dans l'eau (en % des protéines totales)	13,9	21	36
	Bailey		Hasselbach et Schneider (*)

(*) Hasselbach (W), Schneider (G) - Biochem. Z. 1951, 321, 462

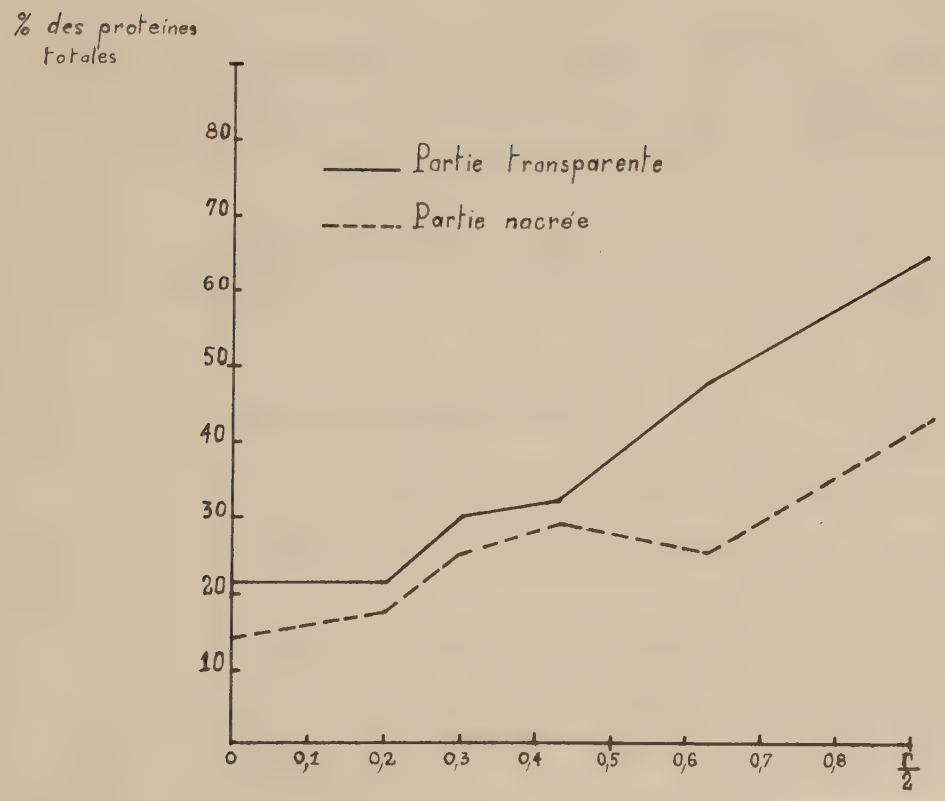


Figure 7.- Extractibilités de la partie transparente et de la partie nacrée du muscle adducteur de l'huître.
Solutions d'extraction : (solutions de KCl de forces ioniques diverses - tampon phosphate pH 6,8).

Le tableau XII réunit toutes les solutions d'extraction que nous emploierons.

La capacité tampon de ces solutions est acceptable. Les pH varient entre 7,5 et 7,4. L'effet de sel est donc peu important. D'après MORTON (162) le pouvoir solvant des cations et des anions vis à vis des protéines peut s'énoncer ainsi :

$$Li > \underline{K} > Na$$

$$P_2O_7 > B_4O_7 > \underline{PO_4} > CNS > HCO_3 > I > Cl$$

Nous nous plaçons donc dans une bonne moyenne. En outre, tous les ions que nous avons choisis sont normalement présents dans les cellules vivantes.

La figure 8 situe le tampon choisi, par rapport à différents pH de référence. Ce tampon est au pH du milieu intérieur de l'huître et il sera en mesure d'absorber d'une façon convenable les variations du pH musculaire.

Nous exposerons ultérieurement les résultats tant qualitatifs que quantitatifs obtenus à l'aide de ces diverses solutions.

Centrifugation et dialyse

A la fin de l'agitation, nous procédons à deux centrifugations, à une dialyse, puis à une troisième et dernière centrifugation.

Toutes ces opérations se déroulent à + 4° C, les centrifugations en centrifugeuse réfrigérée "High Speed 18" M.S.E. (*) munie de rotors angulaires, et la dialyse dans une chambre froide. Les conditions techniques sont les suivantes :

(*) MSE, Buckingham Gate, London S.W.1. England.

TABLEAU XII

Solutions d'extraction retenues

Solutions d'extraction	Force ionique $\frac{\Gamma}{2}$	pH à +25°C	Capacité tampon β à + 25°C	Conductivité à + 15°C (en tenant compte de la Cté de cellule 0,54)
Na_2HPO_4 - 0,0156 M KH_2PO_4 - 0,0035 M	0,05	7,5	# 0,36	2,5 mMho cm^{-1}
Na_2HPO_4 - 0,0156 M KH_2PO_4 - 0,0035 M KCl - 0,10 M	0,15	7,45		12,5 mMho cm^{-1}
Na_2HPO_4 - 0,0156 M KH_2PO_4 - 0,0035 M KCl - 0,20 M	0,25	7,4		22 mMho cm^{-1}
Na_2HPO_4 - 0,0156 M KH_2PO_4 - 0,0035 M KCl - 0,30 M	0,35	7,5		31,5 mMho cm^{-1}

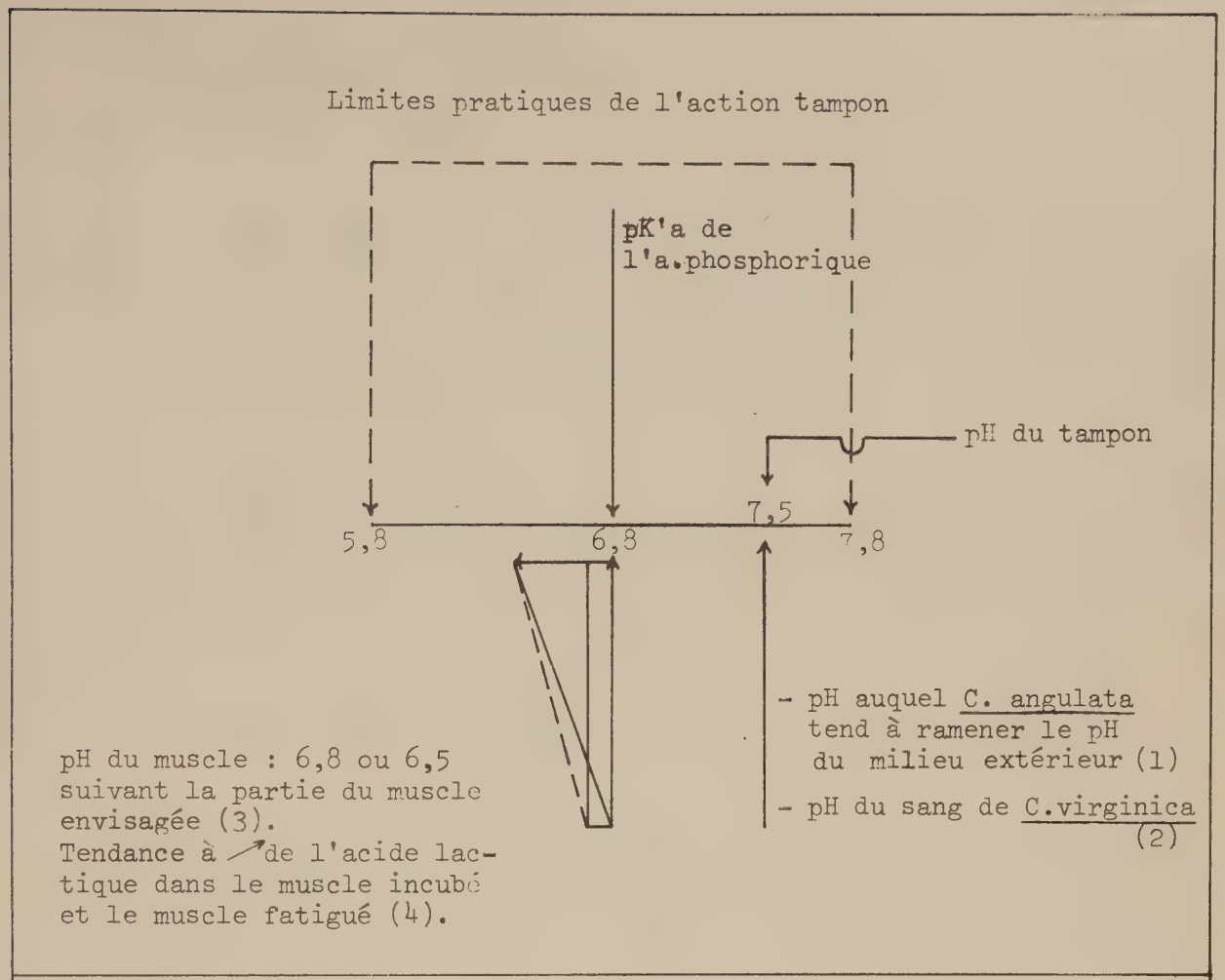
$$\frac{\Gamma}{2} = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2$$

où C_i = concentration en molécules par litre.
Z_i = valence des ions en solution.

$$\beta = \frac{\Delta A}{\Delta(pH)}$$

où ΔA = acide ajouté exprimé en masse équivalente par litre
$\Delta(pH)$ = variation de pH correspondante.

(Une solution possède une capacité tampon unitaire si 1 litre de cette solution peut absorber 1 g équivalent d'un acide complètement dissocié, la variation de son pH n'étant que d'une unité)



(1) - Huître plongée dans une eau de mer artificielle (JULLIEN et RICHARD 119).

(2) - WATABE et KOBAYASHI (261)

(3) - HUMPHREY (101). En outre, le pouvoir tampon du tissu musculaire est meilleur pour la partie transparente que pour la partie nacrée (C. commercialis)

(4) - KOBAYASHI (123) - (O.circumpictata)

Figure 8.- Situation du tampon choisi par rapport à différents pH de référence.

Centrifugation I : à 7.500 t/mn (environ 8.000 g) pendant 30 minutes; on transvase ensuite le surnageant qui est très trouble;

Centrifugation II : à 18.000 t/mn (environ 40.000 g) pendant 2 h 30; le surnageant est limpide, le culot est très fragile, ce qui nous a amené à appliquer le protocole suivant de prélèvement du surnageant (figure 9); l'emploi d'un support oblique et d'un "Perfusor IV" Braun (*) réduit au minimum les risques de destruction du culot;

Dialyse : elle s'effectue en boyaux de cellophane Visking (**) contre 1,5 litre à 2 litres de liquide de dialyse (généralement le tampon d'extraction) changés trois fois; elle dure environ 48 heures et s'opère sous agitation;

Centrifugation III : elle est identique à la centrifugation II.

Les caractéristiques des boyaux sont indiquées au tableau XIII. Ils présentent des différences de perméabilité. Nous n'avons pas cru devoir tenter de réduire la porosité des boyaux 8/32, qui pourrait être réalisée par acétylation.

Les boyaux noircis ou possédant une odeur sulfurée sont rejetés. Les boyaux retenus sont lavés et leur étanchéité est assurée par deux noeuds à chaque extrémité.

Si, éventuellement, la dialyse a lieu contre l'eau distillée, nous suivons le déroulement de l'opération par mesure de la conductivité de l'eau distillée.

Les centrifugations II et III, à 40.000 g pendant 2 h 30 n'ont pas débarrassé les extraits des microsomes ni des éventuels fragments de mitochondries; la présence de ces éléments n'apporte pas de gêne sensible lors des fractionnements.

(*) Braun, Melsungen Germany
(**) Union Carbide Corporation, 6733 west 65th street, Chicago, Illinois 60.638 U.S.A.

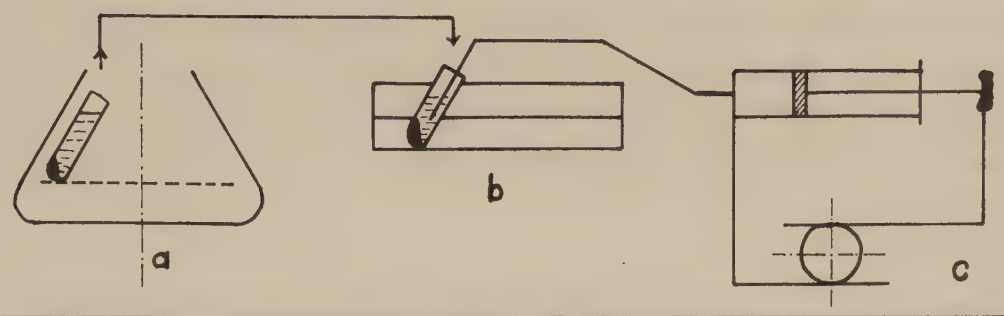


Figure 9.- Prélèvement du surnageant après centrifugation. Rotor (a), support oblique (b), seringue motorisée (c).

TABLEAU XIII

Caractéristiques des boyaux de dialyse employés.

Visking seamless cellulose tubing	Données du fabriquant	Données de la littérature*		Notre utilisation
		Perméable à	Imperméab.à	
18 / 32	Ø moyen des pores 24 Å (glycérine + cellulose + eau + composés sulfurés)	P.M. 3.300	P.M. 5.732	La plus courante
8 / 32		P.M. 5.732	P.M.20.000	Pour les très faibles volumes

(*) MORRIS (C.J.O.R.) et MORRIS (P) - Separation methods in Biochemistry 1963, Pitman and sons, London.

Conservation des extraits

La méthode idéale est d'employer les extraits immédiatement après leur préparation, ce que nous avons fait au début de notre étude. Mais, très rapidement, il ne nous a plus été possible de procéder ainsi devant le nombre d'opérations que nous étions dans l'obligation de réaliser sur ces extraits.

Nous avons employé deux méthodes de conservation des extraits : la lyophilisation et la congélation.

Pour la lyophilisation, les extraits sont répartis en flacons du type "pénicilline", sous une épaisseur ne dépassant pas 5 mm. Les flacons sont plongés dans un mélange éthanol - neige carbonique pendant 20 minutes. La température de précongélation ne s'élève jamais au dessus de - 65° C. La lyophilisation proprement dite dure 7 heures sur un appareil "en hérisson" (*). Les flacons bouchés et sertis sont ensuite stockés à la chambre froide à + 3° C.

Avant la lyophilisation, nous avions d'abord précongelé nos extraits dans un bain d'éthanol à - 40° C en imprimant aux flacons un mouvement de rotation, mais nous avons abandonné cette méthode qui augmentait les dangers de dénaturation.

Pour la congélation, les flacons précongelés à - 40° C pendant 2 heures sont stockés à - 30° C jusqu'à leur utilisation.

Nous exposerons plus loin les différences que nous avons pu remarquer entre les deux méthodes de conservation, mais nous pouvons déjà indiquer, dans le cas des extraits faiblement concentrés, la possibilité de reprendre les lyophilisats par de faibles volumes de solvant d'où concentration plus forte en protéines.

(*) Martin Christ - Osterode (RFA)

Pour une série d'analyse répartie dans le temps sur un même lyophilisat, nous le reprenons par le solvant approprié et répartissons la solution dans plusieurs micro-tubes. Nous les précongelons débouchés, puis les stockons, bouchés, au congélateur à - 30° C. Cet extrait reste utilisable pendant 1 mois, si l'on se rapporte aux recommandations concernant les Versatols (*). Mais, tout tube sorti du congélateur ne doit pas être recongelé.

Détermination de la teneur en protéines

Il est illusoire de vouloir doser les protéines de solutions aussi hétérogènes que celles que nous obtenons, chaque protéine absorbant spécifiquement pour son propre compte. Nous pouvons cependant envisager une estimation intéressante en adoptant une méthode répondant aux impératifs suivants :

- simplicité et rapidité,
- sensibilité permettant une prise d'essai la plus faible possible, économisant l'échantillon,
- récupération éventuelle de la prise d'essai,
- interférence faible des acides aminés aromatiques, en raison de la présence éventuelle dans nos extraits d'une fraction protéique qui serait exempte de certains acides aminés arômatiques.

Nous avons écarté les méthodes turbidimétriques, la méthode de GORNALL (67) et celle de LOWRY (139), pour choisir une méthode spectrophotométrique dans l'ultra-violet.

L'absorption à 280 mμ (ou 280/260 mμ pour tenir compte de la présence d'acides nucléiques - 260), qui est due à la tyrosine et au tryptophane, est de ce fait inapplicable dans nos déterminations.

Au-dessous de 230 mμ, l'absorption intense est due en majeure partie aux liaisons peptidiques, ce qui offre des avantages; les acides aminés aromatiques interviennent peu ou pas et l'absorption spécifique de protéines diverses varie peu dans cette région.

(*) Précibio, 2, rue Lhomond, 75 - Paris Ve - France.

L'absorption à 210 mμ, conseillée par TOMBS et coll. (243)(244), est excellente. Nous avons dû y renoncer devant les difficultés rencontrées : elle implique une surveillance continuelle de la source U.V. et nécessite une limpidité parfaite du milieu.

Nous avons adopté la méthode de WADDELL (259) qui utilise l'absorption différentielle à 215 et à 225 mμ, appliquée au sérum et au liquide céphalo-rachidien et employée par MURPHY et KIES (166) aux protéines du cerveau. C'est une méthode simple et rapide ne demandant qu'une dilution et deux lectures au spectrophotomètre. Elle est précise, sa sensibilité s'étend de 10 à 100 μg/ml, ce qui permet une prise d'échantillon minime. L'influence des amino-acides arômatiques est faible. L'erreur due à la diffusion de la lumière est peu importante. Elle ne demande pas les précautions instrumentales de la méthode à 210 mμ.

Les extraits sont dilués à l'aide du tampon d'extraction qui sert de blanc. Les lectures sont faites au spectrophotomètre électronique Stand M VI Jobin-Yvon (*). Comme protéine de référence, nous avons utilisé l'albumine de sérum bovin. La formule suivante donne la concentration en μg de protéine par millilitre :

$$a = (\Delta\, 215 - 225) \times 144$$

Cette méthode d'estimation des protéines n'exclut pas, lors des fractionnements pour suivre les effluents des colonnes chromatographiques, le recours à d'autres méthodes : absorption à 280 mμ, méthode du biuret, étude du rapport 280 mμ / 260 mμ pour l'appréciation grossière du pourcentage d'acides nucléiques dans les fractions.

Extraction différentielle des myogènes et de la globuline X

Divers auteurs (27)(87)(89)(79) se sont efforcés d'extraire séparément les myogènes de la globuline X. Nous inspirant de leurs travaux, nous

---

(*) Jobin-Yvon, 26, rue Berthollet, 94 - ARCUEIL - France.

avons essayé la méthode suivante.

Les muscles sont traités selon la méthode déjà décrite jusqu'au moment de la dialyse. Le tampon d'extraction est le tampon phosphate de force ionique 0,05.

La dialyse a lieu en boyaux Visking 18/32 contre 1,5 litre d'eau distillée, à + 4° C et sous agitation constante. Elle dure 60 heures et le bain de dialyse est renouvelé 8 fois. Il se forme un précipité très abondant.

La conductivité des bains successifs de dialyse est suivie au conductimètre. Alors que le tampon d'extraction a une conductivité de 1850 µMho cm^{-1} à + 4°C, et l'eau distillée 1,1 µMho cm^{-1}, le dernier bain de dialyse a, dans les mêmes conditions, une conductivité de 1,80 µMho cm^{-1}.

Le contenu du boyau de dialyse est centrifugé à 40.000 g pendant 2 heures à la température de + 4° C. Le surnageant est une solution de myogènes qui est lyophilisée.

Le culot est par deux fois lavé à l'eau distillée et centrifugé. Il est ensuite repris par un volume de tampon d'extraction égal à la moitié du volume de l'extrait après dialyse, après agitation manuelle légère et centrifugation à 40.000 g, pendant 2 heures à + 4° C. On recueille le surnageant qui est une solution de Globuline X que l'on lyophilise.

Parallèlement à cette extraction différentielle, on mène toujours, sur le même lot de tissu musculaire, une extraction des protéines solubles dans les solutions salines de faibles forces ioniques, ce qui permet des comparaisons.

Le tableau XIV rend compte du schéma général d'extraction des protéines musculaires solubles dans les solutions de faibles forces ioniques ainsi que de l'extraction différentielle des myogènes et de la globuline X.

TABLEAU XIV

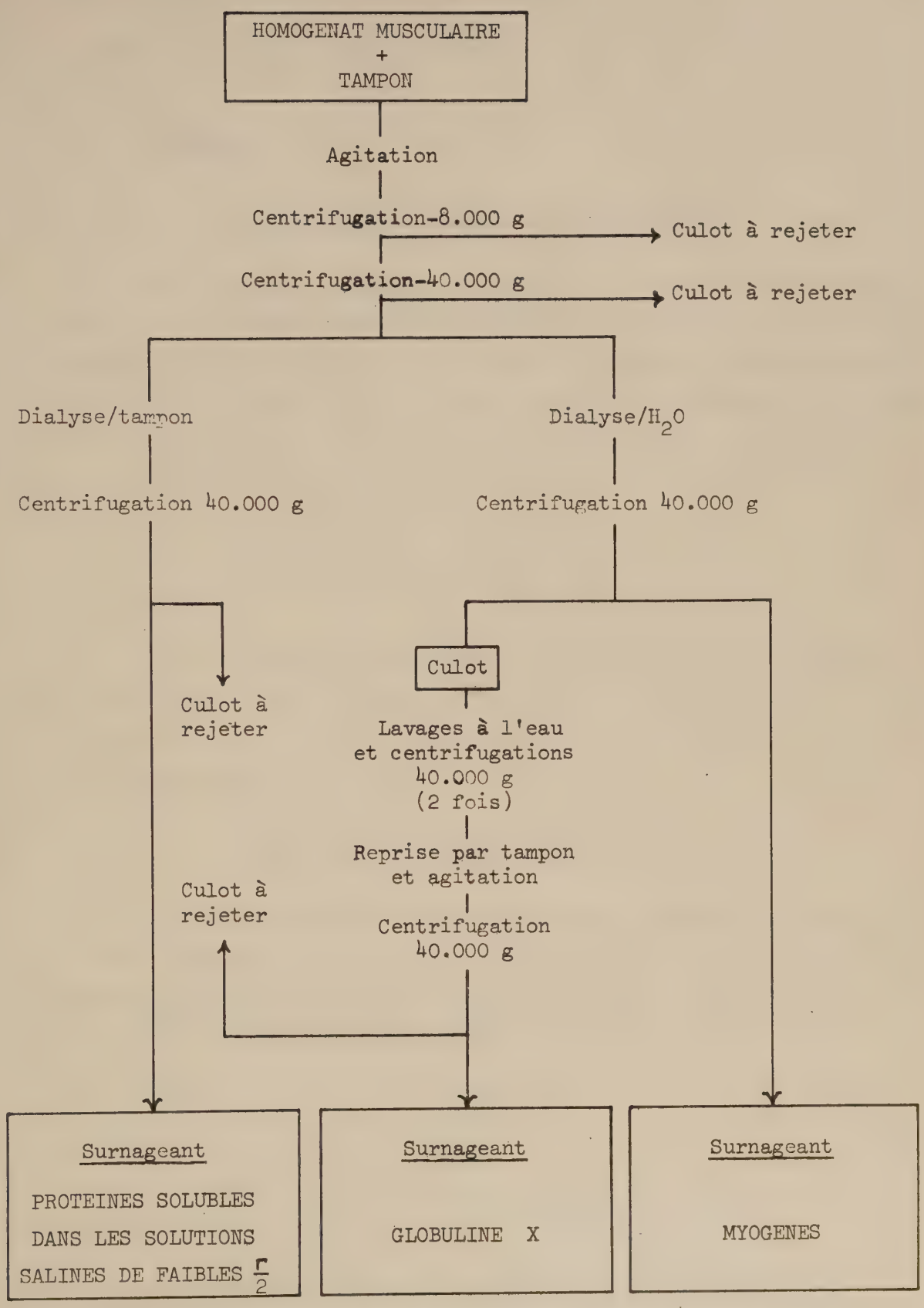


Schéma général d'extraction des protéines solubles du muscle.

Nous citerons pour terminer cette étude des méthodes d'extraction des protéines, quelques variantes que nous avons expérimentées.

Variantes

Réextraction des culots de centrifugation

Dans le but d'extraire totalement les protéines solubles dans un solvant donné, certains auteurs traitent plusieurs fois les culots de centrifugation. Nous n'avons pas retenu cette méthode pour diverses raisons; une extraction complète n'est pas notre propos, une réextraction allonge l'opération, enfin les essais de réextraction du culot de centrifugation III que nous avons effectués fournissent des extraits donnant des images très anormales en électrophorèse.

Confection de poudres acétoniques

Selon la méthode de MORTON (162), nous avons confectionné des poudres acétoniques que l'on extrait ensuite par des solutions salines de faibles forces ioniques. Elles ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants car elles s'altéraient assez rapidement.

Conservation d'organes ou fragments d'organes

La conservation par lyophilisation des fragments de muscles adducteurs que l'on traite en temps voulu par des solvants appropriés semble intéressante mais elle n'offre pas d'avantages particuliers sur la méthode adoptée. Nous l'avons utilisée cependant pour des coeurs d'huîtres.

QUATRIEME PARTIE

METHODES DE FRACTIONNEMENT DES PROTEINES

Nous avons eu recours à trois méthodes fondamentales pour fractionner les protéines de nos extraits de muscle adducteur d'Ostreidae : électrophorèse sur acétate de cellulose, chromatographie d'exclusion-diffusion et électrophorèse en gel de polyacrylamide. Elles font appel à des systèmes poreux :

OGSTON (173) distingue parmi les systèmes poreux :

- des systèmes sans interaction sélective où la matière poreuse n'est qu'un simple support inerte permettant le contrôle des phénomènes de diffusion,

- des systèmes ayant des interactions sélectives dues à leur structure poreuse, soit des interactions de type thermodynamique, amenant une répartition inégale des substances dissoutes à l'intérieur du système, soit des interactions de type hydrodynamique conduisant à différentes vitesses de migration sous l'application d'une force.

Les méthodes que nous avons employées se distribuent entre les trois types de OGSTON :

- L'électrophorèse sur acétate de cellulose utilise un milieu poreux sans interaction sélective sur les substances à séparer. Les molécules se séparent alors selon leur charge électrique.

- Avec la chromatographie d'exclusion-diffusion en gels granulés de Sephadex, les substances dissoutes se répartissent entre une phase fixe située à l'intérieur des granules et une phase mobile qui lui est extérieure. Les molécules se séparent selon leurs dimensions : les plus grosses se déplacent les premières, les autres suivent par ordre de taille décroissante.

- Dans l'électrophorèse en gel homogène de polyacrylamide, les molécules se déplacent selon leur charge, mais en outre elles sont dans l'obligation de "forcer" leur passage à travers les pores du gel. Elles migrent selon leur charge électrique et selon leur taille. Deux molécules de même charge, mais de dimension différente se sépareront et c'est la molécule la plus petite qui aura la mobilité la plus grande.

Nous avons schématisé tous ces systèmes dans la figure 10 et tenté de montrer que l'on peut passer de l'un à l'autre.

Lorsqu'il est question des diamètres des pores d'un système, il faut évidemment prendre en considération les dimensions des molécules que l'on veut séparer. Comme nos mélanges de protéines sont constitués de molécules de tailles bien différentes, pour un milieu poreux donné, nous pouvons avoir des interactions sur certaines molécules et pas sur d'autres. A la limite, certaines molécules migrent librement dans un milieu donné et d'autres ne pourront pas y entrer.

SYSTEMES POREUX		
Sans interaction	Interaction hydrodynamique	Interaction thermodynamique
Acétate de cellulose + - →	+ - diminution du Ø moyen des pores →	Fractionnement de la masse (hypothèse)
+ - augmentation du Ø moyen des pores (*) ←	Gel homogène de polyacrylamide + - →	Fractionnement de la masse (**)
+ - Sephadex fortement réticulés utilisés comme milieu stabilisant en électrophorèse de zones sur colonne (****) ←	+ - Préparation spéciale (***)	Gel granulé de Sephadex

(*) C'est ce qui se passe pour le "sample gel" et le "stacking gel" en disc électrophorèse.
(**) C'est le principe même des Biogel-P (Bio-Rad, Richmond - U.S.A.).
(***) Selon HJERTEN (S) - (94).
(****) MUNIER (R.L.) - (165).

Figure 10.- Possibilités de passage d'un système poreux à un autre.

Ces interactions dues uniquement à la structure poreuse n'excluent pas des interactions d'ordre chimique et physico-chimique auxquelles on ne peut échapper.

Dans une publication de 1966, MORRIS (160) estime que les résultats qu'il a obtenus, après avoir essayé plusieurs méthodes, laissent à penser que la chromatographie sur gel et l'électrophorèse sur gel reposent sur une base commune.

Les méthodes employées l'ont été suivant les techniques analytiques et préparatives dont les résultats se confirment mutuellement.

Les techniques analytiques sont de type micro ou semi-micro analytique.

Les techniques préparatives permettent de séparer certaines fractions protéiques, en quantités relativement importantes, de les recueillir et de les conserver afin de pouvoir les examiner ultérieurement.

I - CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION

La chromatographie d'exclusion-diffusion, encore appelée chromatographie sur gel ou filtration sur gel est une véritable chromatographie. On se trouve en présence d'une phase mobile liquide et d'une phase fixe, représentée par des grains de gel, plus ou moins réticulés, gonflés dans le liquide. Aux principes d'adsorption et de partition de la chromatographie classique, s'ajoute ici la notion de pénétrabilité dans le gel (263). Certaines molécules, de par leurs tailles importantes, sont "exclues" des grains de gel et demeurent en phase mobile; les autres suivant leurs tailles et les dimensions des pores du gel, "diffusent" plus ou moins entre la phase fixe et la phase mobile. Les molécules les plus grosses quittent la colonne les premières, les autres suivent par ordre de taille décroissante.

Pour la séparation des grosses molécules par cette méthode, LATHE et RUTHVEN (132) en 1956 ont utilisé des grains d'amidon gonflés. En 1959, l'Ecole suédoise, avec PORATH et FLODIN (189), a mis au point, sous le nom de "Sephadex" (*) des granules de gel de dextrane réticulé. D'autres substances peuvent être utilisées parmi lesquelles nous citerons les granules de gel de polyacrylamide réticulé et les granules d'agarose, d'emploi courant en biochimie.

Dans de tels systèmes poreux, des interactions de type thermodynamique amènent une répartition inégale des substances dissoutes à l'intérieur des systèmes. On peut ainsi séparer des molécules de tailles différentes et, toutes choses égales d'ailleurs, estimer leurs poids moléculaires. D'autres

---

(*) Pharmacia, Uppsala - Suède.

applications sont possibles, telles l'élimination des sels d'une solution protéique, les changements de tampon et la concentration de solutions diverses.

Indirectement, la chromatographie d'exclusion-diffusion peut permettre des séparations par relargage (50)(188).

Certaines substances dissoutes dans un solvant donné peuvent manifester pour un gel donné des affinités particulières. On ne peut alors parler de chromatographie d'exclusion-diffusion. Nous avons rencontré ce phénomène au cours de nos travaux.

Nous avons toujours travaillé en milieu aqueux et fait appel aux "Sephadex" de la série G.

Les Sephadex existent à divers degrés de réticulation permettant des fractionnements dans un domaine de poids moléculaires donnés. Chaque degré de réticulation est caractérisé par un indice de rétention qui est "la quantité d'eau absorbée par les grains de gel gonflés, sans tenir compte de l'eau qui se trouve autour des grains" (181). Ces produits sont livrés en grains sphériques (perles), présentant de ce fait une faible résistance à l'écoulement, leur diamètre moyen varie suivant les catégories : "coarse", "medium", "fine" et "superfine".

Le tableau XV rassemble les caractéristiques des Sephadex que nous avons employés (181).

La chromatographie en couche mince de gel de Sephadex a été adoptée comme technique analytique, tandis que la chromatographie sur colonne de gel de Sephadex peut être considérée comme préparative.

TABLEAU XV

Caractères des Sephadex employés

Désignation des gels		Diamètre des grains u	Indice de rétention	Domaine de fractionnement (Poids moléculaires) pour les peptides et les protéines globulaires.
Sephadex	Type			
G - 25	superfin	10 - 40	2,5 ± 0,2	1.000 - 5.000
G - 50	superfin	10 - 40	5,0 ± 0,3	1.500 - 30.000
G - 75	fin	40 - 120	7,5 ± 0,5	3.000 - 70.000
G - 75	superfin	10 - 40	7,5 ± 0,5	3.000 - 70.000
G - 100	fin	40 - 120	10,0 ± 1,0	4.000 - 150.000
G - 100	superfin	10 - 40	10,0 ± 1,0	4.000 - 150.000
G - 150	superfin	10 - 40	15,0 ± 1,5	5.000 - 400.000
G - 200	superfin	10 - 40	20,0 ± 2,0	5.000 - 800.000

A - CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DE GEL DE SEPHADEX.

Les premiers travaux sur la chromatographie en couche mince de gel de Sephadex de JOHANSSON et RYMO (113) et de DETERMANN (38) datent de 1962. La méthode depuis lors s'est développée, mais le nombre de publications la concernant est encore restreint.

Plusieurs raisons nous ont amenés à essayer cette méthode :

- d'une part son aspect microanalytique, la rapidité et l'économie,
- d'autre part le bon pouvoir de séparation, l'estimation aisée des poids moléculaires et le choix des gels en vue de la chromatographie sur colonne.

Dans une récente publication (156), nous avons indiqué le matériel utilisé et la méthode telle que nous la pratiquons.

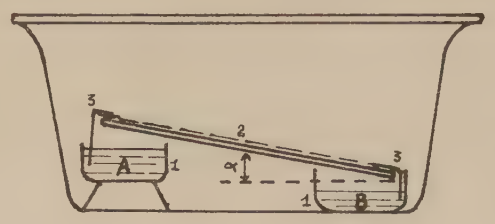
Matériel et méthode.

Le matériel est schématisé sur la figure 11 a. Les différents points de la méthode sont précisés ci-après :

1) Préparation des gels

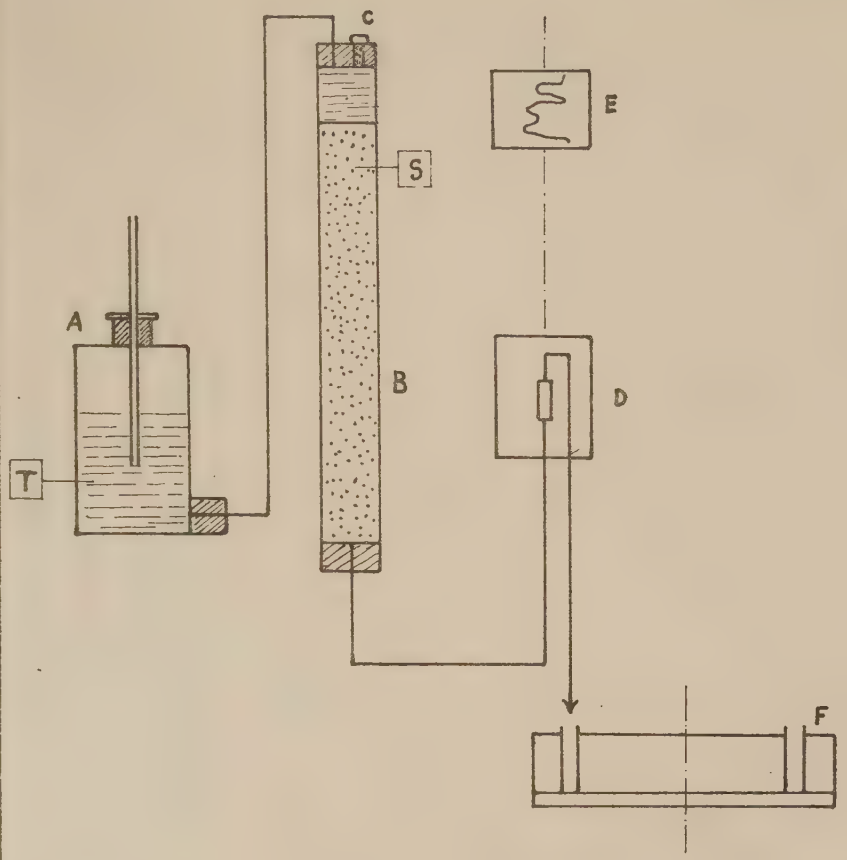
Dans les débuts de la chromatographie en couche mince de gel de Sephadex, les expérimentateurs ont utilisé la qualité "fine". Actuellement, l'emploi des Sephadex "superfine" est prépondérant. Certains auteurs utilisent des mélanges de Sephadex et d'échangeurs d'ions (237).

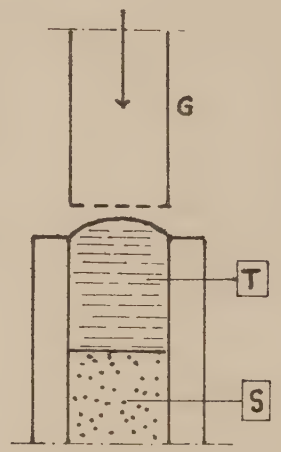
Généralement, les Sephadex sont mis à gonfler dans des solutions tampons qui servent en outre au développement. Les tampons les plus employés sont des tampons phosphate de pH 7 dont la force ionique est parfois augmentée par addition de NaCl (113)(69)(212). D'autres auteurs ont recours à des



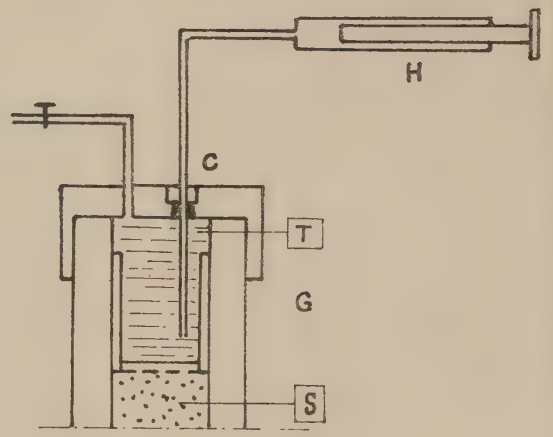
1: réservoirs à tampon.
2: plaque recouverte de gel.
3: papiers servant à la perfusion.
α: angle d'inclinaison de la plaque.

Figure 11a.- Schéma de la cuve de chromatographie en couche mince de gel de Sephadex.





Pose de l'applicateur d'échantillon



Injection de l'échantillon

Figure 11b.- Schéma de la colonne de chromatographie, de l'absorptiomètre et du collecteur de fractions.

T : tampon, S : Sephadex, A : Vase de Mariotte, B : colonne, C : orifice de purge, D : absorptiomètre, E : enregistreur, F : collecteur, G : applicateur d'échantillon, H : seringue.

tampons Tris (2) ou Véronal (258). Des solutions de sels neutres, non tamponnées,sont parfois utilisées (159).

Le gonflement a lieu dans une quantité plus ou moins importante de tampon allant jusqu'à 100 ml par gramme de Sephadex (51). A la fin du gonflement, le surnageant est éliminé.

Le tableau XVI indique les types de Sephadex, les volumes de tampon et les temps de gonflement que nous avons adoptés après des essais préliminaires tenant compte des recommandations du fabricant (181)(182). Nous avons dû, par exemple, ajuster à 25 ml le volume de tampon nécessaire par gramme de G-150, car avec le chiffre conseillé, nous n'obtenions pas de surnageant.

TABLEAU XVI

Utilisation des Sephadex superfins

Type de Sephadex	Quantité de tampon (en ml) ajoutée à 1 g. de Sephadex sec.	Durée minimum de gonflement (à 16°)
G-25 "superfine"	5	3 H
G-50 "	11	3 H
G-75 "	15	24 H
G-100 "	19	72 H
G-150 "	25	72 H
G-200 "	25	72 H

Pour le gonflement des gels et le développement ultérieur, nous avons fait choix du tampon d'extraction des protéines étudiées, c'est-à-dire, le plus généralement, un tampon phosphate de pH 7,5 et de force ionique 0,05. Nous avons essayé ce même tampon additionné de NaCl (11,7 grammes par litre)

pour en augmenter la force ionique, mais les résultats n'ont pas été satisfaisants.

La suspension est agitée périodiquement. Au moment de la confection des plaques, nous éliminons le surnageant à l'aide d'une seringue munie d'un tube fin en polyéthylène.

2) Confection des plaques

La majorité des auteurs utilisent des plaques de verre carrées (20 x 20 cm ou 30 x 30 cm) rectangulaires (de 5 x 20 cm à 20 x 50 cm). WILLIAMSON (265) utilise de vieilles plaques photographiques.

FASELLA (51) coule directement la suspension de Sephadex dans des récipients en verre ou en plastique. Lorsque le gel s'est déposé, il retire le surnageant à l'aide de papier-filtre. BERGSTROM (10) verse la suspension sur une plaque de verre cannelée.

Les étaleurs du commerce sont très employés. Cependant, STRANSKY (238) utilise une baguette de verre munie à chaque extrémité de ruban adhésif; les épaulements ainsi réalisés correspondent à l'épaisseur désirée de la couche de Sephadex.

Les épaisseurs des couches varient avec les auteurs de 0,2 à 1 millimètre; la plus courante est 0,5 millimètre.

Nous utilisons des plaques de verre calibrées : 5 x 20 cm et 20 x 20 cm, soigneusement nettoyées et passées à l'acétone. Nous traçons une ligne de départ au verso de la plaque et à 3 centimètres du bord supérieur.

Le gel est uniformément réparti sur les plaques à l'aide d'un étaleur de STAHL (*). L'épaisseur de la couche est de 0,5 mm. Nous attendons

(*) Desaga - Heidelberg (RFA).

10 minutes avant de manipuler les plaques pour les placer dans les cuves de chromatographie.

3) Cuves à chromatographie

DETERMANN (39) utilise une "chambre-sandwich", JOHANSSON (113), GRANT (69) et HANSON (84) des cuves à électrophorèse sur papier, mais en général, les auteurs emploient de simples boîtes fermées en matière plastique ou en verre; ils donnent une certaine inclinaison aux plaques, variant de 10° à 20°.

Les réservoirs à tampon sont reliés aux plaques par du papier filtre dont la qualité varie avec les auteurs.

La méthode de GRANT (69) est particulière. Il dispose ses plaques horizontalement sur deux réservoirs de même hauteur, mais dont les niveaux de tampon sont différents.

Nous employons des cuves de chromatographie en matière plastique, de section carrée (30 sur 30 cm), d'une hauteur de 20 cm, avec couvercle de verre. A l'intérieur, deux réservoirs à tampon sont disposés de telle façon que la plaque qui y repose fasse un angle de 10° avec l'horizontale. Avec un angle de 15°, nous avons eu de moins bons résultats, car la migration est trop rapide. La plaque est reliée aux deux récipients par des bandes de papier Whatman 3 MM, préalablement humectées de tampon, qui assurent une bonne perfusion.

Nous plaçons 210 ml de solution tampon dans le bac A et 100 ml dans le bac B. L'emploi d'un seul bac entraîne une migration irrégulière; le tampon s'accumule au bas de la plaque et exerce une contre-pression néfaste.

Une mise en équilibre préalable de 16 heures régularise la migration ultérieure.

4) Développement

La majorité des auteurs dépose l'échantillon à étudier sous la forme d'une tache circulaire de faible diamètre, à une distance variant de 1 à 4 cm du bord de la plaque. RADOLA (194) se sert d'une lamelle couvre-objet pour appliquer ses substances sous forme de traits.

Pour suivre la migration, les expérimentateurs emploient des substances de référence colorées : bleu dextran 2000 (*), cytochrome c, hémoglobine, hémocyanine, myoglobine; parfois, du bleu de bromophénol, du noir amide ou de l'isothiocyanate de fluorescéine sont mélangés aux échantillons protéiques.

Les temps de développement sont très variables : 30 à 40 minutes (238) 16 à 20 heures (84), mais le plus couramment 4 à 5 heures.

Les auteurs donnent peu de précision sur la température à laquelle ils opèrent.

Dans notre technique, sur la ligne de départ, nous déposons les échantillons sous forme de taches circulaires à l'aide d'une micropipette. Les taches sont éloignées l'une de l'autre de 2 centimètres. Les volumes d'extraits (de 4 à 6 µl) correspondent à 45 µg de protéine. La substance de référence est le bleu dextran 2000 en solution à 0,4 % dans le tampon; de par son poids moléculaire très élevé, elle est exclue et permet de suivre le développement.

Le temps nécessaire à une bonne séparation de nos extraits varie avec le type de gel pour un angle donné de la plaque (Tableau XVII). La vitesse de migration augmente avec la température. Des essais accomplis à + 4°C, + 16°C, + 22°C nous ont amenés à choisir une température constante de + 16°C en salle conditionnée. Le développement à + 4°C n'est pas satisfaisant.

(*) Pharmacia, Uppsala - Suède.

TABLEAU XVII

Temps de migration dans les divers gels, pour une inclinaison de la plaque de 10° et une température de 16°C.

Gels	G-50	G-75	G-100	G-150	G-200
Temps	3 H 30	2 H 30	3 H	4 H 30	5 H 15

5) Révélation des chromatogrammes

Certains auteurs sèchent la plaque à + 60°C ou à + 80°C et la colorent directement avec les colorants classiques : noir amide, bleu de bromophénol etc ... ANDREWS (2) soumet ses plaques aux vapeurs d'iode dans une enceinte fermée. POMERANZ (187) consolide la couche de Sephadex avec une solution d'agar.

D'autres transfèrent les protéines sur un support : papiers de chromatographie ou acétate de cellulose pour électrophorèse (258) (1). Ce support est intéressant pour une électrophorèse ultérieure ou des études d'immunodiffusion. Après fixation, les supports sont colorés normalement. Citons cependant l'emploi par DETERMANN (39) de la réaction de PAULY (diazocopulation).

Nous avons expérimenté toutes ces méthodes.

La fixation et la coloration directe du gel, même après pulvérisation d'une solution d'agar à 1,5 % ne nous ont pas donné satisfaction.

Nous préférons employer un support de transfert : acétate de cellulose ou papier.

Des bandes d'acétate de cellulose, préalablement imbibées de tampon,

sont placées avec soin sur le gel en évitant la formation de bulles; on laisse en contact 10 minutes, puis on les plonge dans un bain de fixation coloration au vert de lissamine (C.I. 42095) ou au noir amide de préférence.

Pour le transfert sur papier, nous utilisons le plus fréquemment le Whatman 3 MM. Cependant, celui-ci s'imbibe mal sur G-25 ou G-50; nous lui préférons alors le Whatman n° 1 ou l'Ederol 202. Le papier, coupé aux dimensions de la plaque, est appliqué progressivement sur le gel, la face lisse contre le Sephadex. Nous avons standardisé le temps de contact à deux minutes. Un temps trop long entraîne une diffusion des taches. Nous marquons au crayon la ligne de départ ainsi que le contour des taches colorées et portons l'ensemble à l'étuve à + 70°C pendant 30 minutes pour fixer les protéines. La fixation par une solution d'acide sulfosalicylique ne nous a pas donné de bons résultats.

La coloration au noir amide ne nous ayant pas donné satisfaction, plaque et papier, une fois refroidis, sont colorés dans une solution de vert de lissamine à 0,2 % dans de l'acide acétique à 5 %, pendant une heure, sous agitation légère. Le papier se détache de la plaque. Une décoloration par 4 bains successifs de 15 minutes dans une solution d'acide acétique à 5 % fait apparaître des taches vertes sur fond blanc.

Après décoloration, l'acétate de cellulose est transparisé; le papier est séché verticalement à l'étuve à + 70°C.

6) Estimation qualitative et semi-quantitative des chromatogrammes.

La possibilité de faire migrer plusieurs extraits sur une même plaque rend aisées les comparaisons.

Pour exprimer la mobilité des diverses fractions, nous employons le rapport :

$$R_b = \frac{\text{déplacement de la fraction protéique étudiée}}{\text{déplacement du bleu dextran 2000}}$$

La mesure semi-quantitative de l'importance relative des diverses fractions a été effectuée en densitométrie par réflexion (*). Pour le vert de lissamine, nous employons un filtre de bande, rouge, centré sur 620 mμ. L'enregistrement se fait en densité optique. Un intégrateur nous permet d'évaluer la surface d'un pic entre les deux perpendiculaires menées à la ligne de base, à partir des minima entre les pics. Nous transformons les résultats obtenus en pourcentages.

L'estimation des poids moléculaires (M) fait appel à des protéines de référence de poids moléculaires connus. Nous traçons la courbe selon la formule :

$$R_b = K \log M$$

Etude de quelques points particuliers.

Quelques problèmes ont particulièrement retenu notre attention.

1) La quantité d'échantillon déposée

Nous obtenons, en G-100 par exemple, un chromatogramme exploitable avec une quantité d'extrait correspondant à 10 μg de protéine. La méthode est donc sensible. Cependant, c'est avec 45 μg que nous avons les meilleurs résultats. Pour des concentrations trop fortes, l'image chromatographique est déformée (figure 12). Des volumes trop importants d'extrait donnent des taches étalées. Le volume optimal est voisin de 5 μl.

2) Etude du temps de développement

Pour chaque type d'extrait et chaque type de Sephadex, nous avons déterminé le temps optimum de développement.

Prenons comme exemple le développement d'un extrait protéique de muscle adducteur total de Crassostrea angulata, sur Sephadex G-100 (figure 13).

(*) Chromoscan - Joyce Loebl - Gateshead-on-Tyne (G.B.)

Figure 12.- Extrait trop concentré en protéines

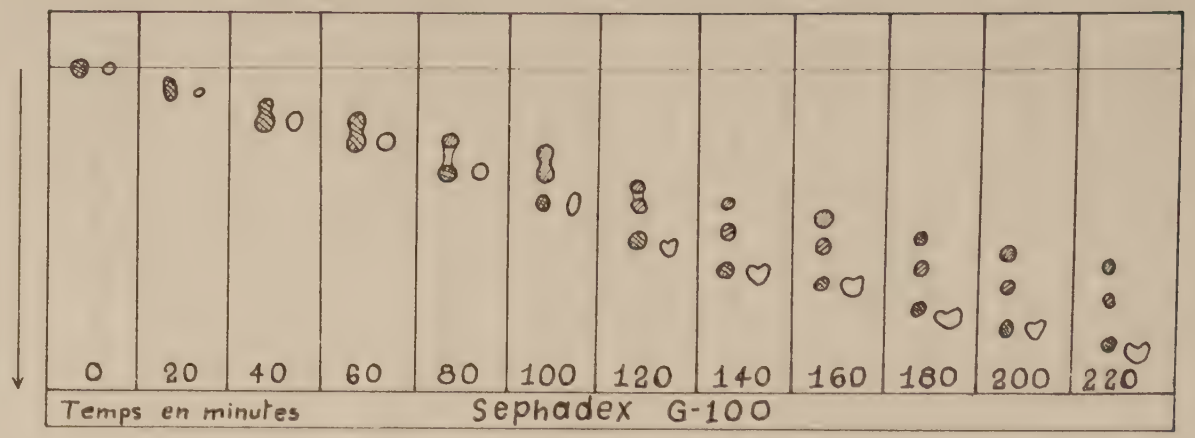


Figure 13.- Chromatographie en couche mince d'un extrait protéique en fonction du temps.

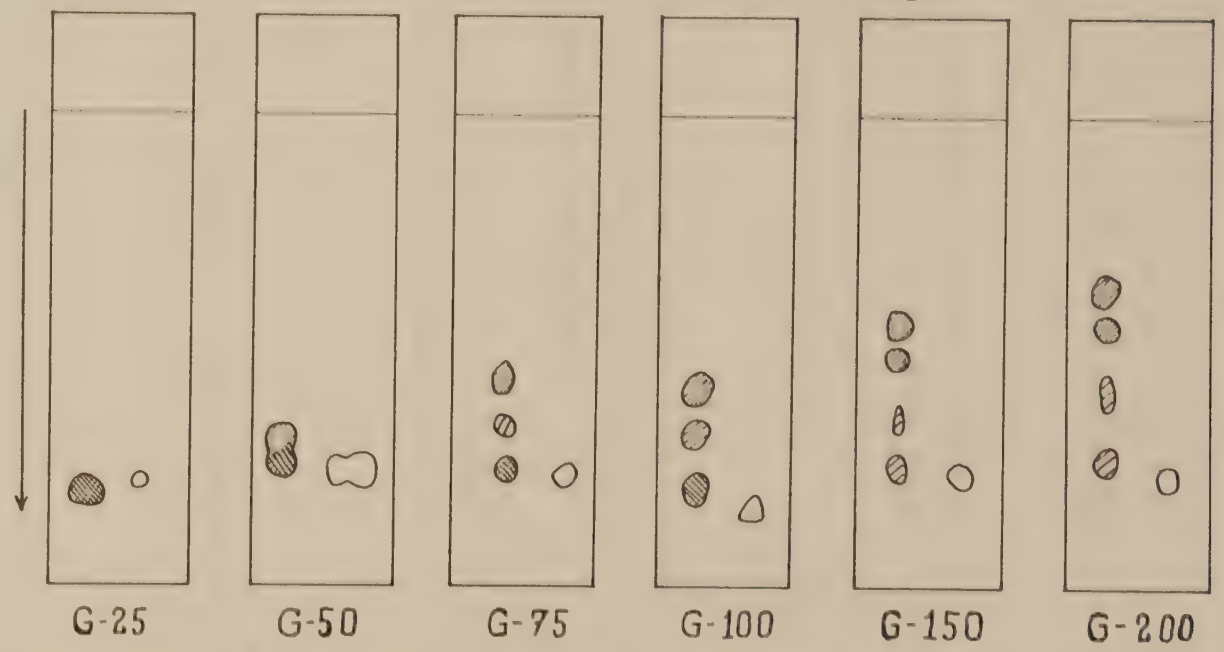


Figure 14.- Chromatographie en couche mince d'un même extrait sur divers types de Sephadex.

Nous avons préparé une série de 12 plaques. Sur chacune, nous avons déposé 5 µl d'extrait en un spot de départ et 5 µl d'une solution de bleu dextran 2000 en un deuxième spot. Les plaques, disposées dans les cuves à chromatographie, sont prélevées toutes les 20 minutes, puis recouvertes de papier Whatman 3 MM, fixées et colorées.

En comparant les chromatogrammes successifs, nous voyons le spot de départ se fragmenter en deux parties dès la troisième plaque, puis, peu à peu, les fragments s'éloignent l'un de l'autre. A partir de la sixième plaque, la seconde tache se fragmente en deux nouvelles, et l'on voit se préciser la séparation finale.

La régularité du déplacement de la tache de bleu dextran, substance complètement exclue, apparaît nettement sur les chromatogrammes : elle est démonstrative du bon déroulement de l'opération.

Le temps optimum de développement est de 180 minutes. Un temps de migration plus long n'apporte pas une meilleure séparation.

3) Choix d'un gel

Parmi les six types de gels étudiés, nous avons choisi les mieux adaptés à notre étude. La figure 14 illustre le comportement d'un extrait donné sur les divers Sephadex.

Le G-25 a été employé à titre démonstratif, son domaine de fractionnement étant en dessous du poids moléculaire de la plus petite molécule protéique. Sur G-50, on observe un début de fractionnement. Sur G-75, apparaissent trois taches qui sont encore mieux différenciées sur G-100 (taches 1, 2 3), ce que confirme la densitométrie. Sur G-150 et G-200 apparaît, entre les taches 1 et 2,une zone de fractionnement assez mal définie, provenant de la division de la tache 1. Nous l'appellerons 1'.

Après ces essais, nous avons retenu le G-100 et le G-200. Le G-100 nous donne trois "pics" bien définis, 1, 2, 3, et le G-200 permet un frac-

tionnement du "pic" le plus rapide en 1 et 1'.

4) Exploitation densitométrique des chromatogrammes

Nous avons écarté la technique d'élution des fractions pour ne retenir que la densitométrie. L'élution, avant ou après coloration, est longue; elle détruit les chromatogrammes et bien souvent son aspect quantitatif n'est qu'une illusion. Par contre, la densitométrie est rapide et permet la conservation de documents.

a - Le transfert sur papier

Lorsque l'on applique le recto du papier sur la couche de gel, les solutions protéiques montent entre les fibres par capillarité. Tout se passe comme si l'aspiration s'arrêtait au sein du papier pour les zones de faible concentration et atteignait le verso du papier pour les zones de forte concentration. Le recto du papier apparaît, après traitement, presque uniformément coloré, alors qu'au verso, on observe une succession de zones claires et de zones colorées.

Nous avons tenté de préciser ce phénomène en remplaçant le Whatman 3 MM par un empilement de feuilles de faible épaisseur. Ainsi, nous espérions pouvoir suivre la migration des protéines au sein du papier, mais l'expérience n'a pas donné les résultats que nous espérions.

Le phénomène que nous avons décrit montre qu'il y a une certaine proportionnalité entre la concentration en protéine à l'intérieur du gel de Sephadex et dans le papier de transfert.

L'acétate de cellulose possède un faible pouvoir d'absorption. Nous l'avons écarté sauf pour des cas bien particuliers.

b - L'aspect du chromatogramme

Les taches colorées, très légèrement ovales, n'ont pas tendance à

s'allonger comme cela se produit parfois en chromatographie de partage sur papier. Pour une chromatographie donnée, les fractions séparées ont des surfaces sensiblement égales.

On ne trouve pas, entre les taches, de solution de continuité et il existe parfois une traînée en arrière de la tache la plus lente. Ceci pouvant être dû à l'effet de la plaque de verre sur la chromatographie, nous avons siliconé (dimethyl-dichloro-silane) une plaque, mais n'avons noté aucune amélioration.

La chromatographie d'exclusion-diffusion est une chromatographie linéaire dont les zones devraient être symétriques. Mais, nos extraits sont des mélanges de protéines dont les poids moléculaires se différencient progressivement. Les protéines vont donc se répartir tout au long du diagramme de concentration et nous ne pourrons en aucun cas les séparer complètement. Ceci explique l'absence de discontinuité entre les taches et la traînée due à de petites molécules "lissamine positives" fortement retardées.

Nous n'envisagerons pas spécialement la question de l'affinité du colorant pour les diverses fractions protéiques de nos extraits qui est des plus variée et qui peut fausser une estimation quantitative.

c - La densitométrie

L'aspect de nos chromatogrammes demanderait l'emploi d'un densitomètre de type "flying spot". Cependant, avec un densitomètre classique double faisceau donnant des enregistrements en densité optique les courbes obtenues reflètent assez bien la réalité. Nous avons pu nous en rendre compte en les comparant avec les résultats sur colonne. La transparisation du papier ne nous ayant pas donné satisfaction, nous avons densitométré par réflexion le verso du papier.

Nous avons dû standardiser la méthode au maximum :

- dépôt sur le gel de la même quantité de protéine dissoute dans le même volume de solvant,

- emploi de papiers d'empreinte provenant du même lot de fabrication,
- temps de contact du papier avec le gel fixé à 2 minutes,
- fixation, coloration, décoloration strictement contrôlées,
- densitométrie effectuée toujours avec le même filtre et la même fente.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE GEL DE SEPHADEX.

La chromatographie sur colonne de gel de Sephadex a précédé de plusieurs années la chromatographie en couche mince de gel de Sephadex. La technique de la colonne "fermée" a naturellement amené la technique en couche mince, dite de la colonne "ouverte" (235).

La technique sur colonne de gel de Sephadex nous permet :

- sur le plan analytique, de contrôler et préciser les résultats obtenus sur plaque,
- mais, sur le plan préparatif, son principal but, elle permet de séparer et recueillir des fractions que l'on peut soumettre à des manipulations ultérieures.

Matériel et méthode

1) Matériel utilisé (fig. 11 b)

Nous utilisons des colonnes (*) en verre de 45,5 cm de long et de 2,5 cm de diamètre intérieur. Le volume utile est de 198 ml. Un tamis de nylon retient le gel à la partie inférieure. Le volume mort, en bas de colonne, est très réduit. Elles sont équipées d'un applicateur d'échantillon. Le bouchon supérieur est muni d'un orifice de purge qui facilite les manipulations.

(*) Colonne K 25/45 - Pharmacia Uppsala, Suède.

Nous nous servons de ces colonnes en élution descendante et utilisons un vase de Mariotte pour l'alimentation en éluant. L'essai d'une pompe péristaltique ne nous a pas donné satisfaction. Le vase de Mariotte est relié au sommet de la colonne par un tube de polyéthylène de 3 mm de diamètre intérieur. Le tube de sortie de colonne a un diamètre de 1 mm.

L'éluat est recueilli sur un collecteur de fractions pouvant travailler en fonction du temps, en comptage de gouttes ou en volumes.

Nous employons comme appareil de détection :

- un absorptiomètre enregistreur (*) à rayons ultra-violets, muni d'un filtre interférentiel centré sur 280 mμ, à bande passante de 20 mμ, à microcuve en quartz alimentée en continu, à trajet optique de 3 mm; cet appareil permet la détection en continu des protéines, l'enregistrement se fait en % de transmission,
- un spectrophotomètre U.V. - visible, équipé d'une microcuve de 10 mm de parcours optique,
- un conductimètre,
- un pH mètre.

Toutes les opérations se déroulent en chambre froide à + 3° C.

2) Gonflement des gels - Charge de la colonne

Nous utilisons deux types de Sephadex.

Sephadex G-75 "fine" (Lot n° 7209)
Sephadex G-100 "fine" (Lot n° 1395)

Leurs caractéristiques figurent au tableau XV.

(*) Gilson Medical Electronics - Villiers le Bel - (France).

Le tampon de gonflement, comme celui d'élution est le tampon phosphate d'extraction des protéines (pH 7,5 ; μ 0,05).

15 g de G-75 ou 13 g de G-100 sont mis à gonfler, à la chambre froide, dans 300 ml de tampon refroidi à + 3° C. Les temps de gonflement sont respectivement de 70 et de 120 heures. Nous avons largement augmenté les temps de gonflement, pour tenir compte de la température. Les suspensions sont décantées et agitées plusieurs fois.

La colonne, bien verticale, est munie à son extrémité inférieure d'un tube en polyéthylène de 1 mm de diamètre intérieur et d'une longueur légèrement supérieure à celle de la colonne.

Deux points doivent retenir l'attention :

- la purge de l'air qui peut rester emprisonnée en bas de colonne,
- et la pression de remplissage qui doit rester voisine de la pression de travail.

Nous commençons par verser du tampon dans la colonne et purger l'air à l'aide d'une seringue. Nous fermons alors l'orifice du tube de sortie et versons la suspension de gel dont le surnageant a été éliminé en grande partie. On laisse le gel se déposer pendant quelques minutes. On ouvre le tube de sortie dont l'extrémité située au niveau supérieur du liquide, est abaissée graduellement de façon que la distance niveau du liquide - extrémité du tube soit voisine de la pression de travail. Le gel se dépose, le liquide s'écoule. Avant le dépôt complet du gel, on ajoute en plusieurs fois le reste de la suspension de Sephadex. L'opération demande plusieurs heures. Nous travaillons généralement à une pression hydrostatique de 5 à 7 cm.

Le remplissage terminé, nous fermons le tube de sortie et plaçons l'applicateur d'échantillon de la façon que nous préconisons à la figure 11b : le tampon formant un ménisque au sommet de la colonne,l'applicateur y est déposé doucement et on le laisse glisser jusqu'à la surface du gel.

Le bouchon supérieur de la colonne est vissé, orifice de purge ouvert et le second orifice est relié au vase de Mariotte rempli de tampon. Il est ainsi aisé de se débarrasser de l'air qui reste emprisonné en haut de la colonne. La purge est fermée et le vase de Mariotte est disposé de façon à obtenir la pression hydrostatique de travail.

Nous ouvrons le bas de la colonne; le tampon d'élution s'écoule. Le débit se règle, soit en faisant légèrement varier la pression de travail, soit en règlant l'admission du tampon à la sortie du vase de Mariotte. Nous laissons en perfusion libre pendant 48 heures en vérifiant le débit qui doit être constant. Nous travaillons avec un débit constant situé entre 6 et 9 ml/heure.

3) Chromatographie

Les tubes au bas de la colonne, puis à la sortie du vase de Mariotte sont fermés; l'orifice de purge est ouvert. L'extrémité du tube de la seringue est amenée à 2 mm au-dessus de la surface du gel. L'échantillon est injecté lentement sous le tampon à l'interface tampon - gel, à l'aide d'une seringue de 2 ml munie d'un fin tube de polyéthylène (fig. 114). Il doit se répartir en un disque sans se mélanger au tampon. La purge est alors fermée tandis que la sortie du vase de Mariotte, puis le bas de la colonne sont ouverts. L'échantillon descend lentement et régulièrement; lorsque la moitié de son volume a disparu dans le gel, nous comptons le temps t_o.

Nous recueillons l'éluat sur le collecteur de fractions après passage à travers la cellule de l'absorptiomètre. Le collecteur travaille en comptage de gouttes. Nous recueillons généralement 84 gouttes par tube, ce qui correspond à un volume voisin de 2,5 ml.

Une chromatographie complète demande de 25 à 29 heures.

Quelques précisions nécessaires sont présentées ci-après d'une manière schématique.

- Le volume d'échantillon injecté est voisin de 2 ml, ce qui correspond au lyophylisat de 5 ou 10 ml d'extrait contenant de 20 à 50 mg de protéines; si la force ionique de l'extrait est bien supérieure à celle de l'éluant, cela n'a aucune importance en chromatographie d'exclusion-diffusion et peut être utile comme nous le verrons plus loin.

- Il nous est apparu, après quelques essais, que l'addition de saccharose à l'échantillon pour augmenter sa densité n'était pas nécessaire.

- La différence d'indice de réfraction rend bien visible l'échantillon déposé à l'interface tampon - gel et permet de suivre sa disparition dans le gel.

- Nous travaillons à faible pression, car les gels de Sephadex G-75 et G-100 sont très sensibles et leur déformation amène une diminution irréversible de leur débit (117).

- Le travail à faible débit nous a donné entière satisfaction; il est d'ailleurs conforme à la théorie de la chromatographie d'exclusion-diffusion. Nous n'avons jamais eu d'incident de diffusion longitudinale (54). La résolution est meilleure à 7 ml/h qu'à 14 ml/h.

- Malgré l'augmentation de la densité de l'éluat, lors du passage des protéines, la variation des volumes recueillis dans chaque tube du collecteur est très faible.

- Nous n'avons jamais travaillé avec des colonnes de longueur supérieure à 45 cm. Les longues colonnes peuvent donner des fractionnements meilleurs, mais posent des problèmes techniques. Nous envisagerons ultérieurement l'emploi de colonnes de 45 cm avec recyclage recommandée par PORATH (190).

4) Détection des fractions

Nous faisons passer systématiquement les effluents de colonne par la cellule de l'absorptiomètre en continu. Malgré ses imperfections (% de T,

bande passante de 20 mμ), l'enregistrement nous permet de suivre dans son ensemble le long déroulement de la chromatographie. Il nous permet de préciser certains points particuliers des enregistrements obtenus au spectrophotomètre.

Avec une cellule de 10 mm de parcours optique, nous avons observé des effets de "traînée" dus à un dépôt protéique sur les faces de la cellule. Ce dépôt masque totalement les variations de concentration inférieures à celle du maximum du premier pic. L'utilisation d'une cellule de 3 mm de parcours optique supprime ce grave inconvénient.

Les fractions recueillies sur le collecteur sont passés au spectrophotomètre à 280 et 259 mμ. Aux très faibles concentrations, nous travaillons à (215 - 225 mμ). Les protéines colorées sont détectées dans le visible. Nous traçons les diagrammes d'élution en portant en ordonnée les densités optiques et en abcisse le nombre de fractions ou les volumes recueillis.

Nous suivons la conductivité de l'éluat. En fin de chromatographie, nous détectons un "pic de sel". En effet, comme nous l'avons déjà dit, nos extraits ont une conductivité plus importante que celle de l'éluant.

Nous contrôlons au pH-mètre le déroulement de la chromatographie.

5) Mesure de divers paramètres

Nous déterminerons les paramètres Vt, Ve, Vo, Kav, les poids moléculaires et l'importance des différentes fractions.

- Vt, volume total du gel, est le produit de la hauteur du lit de gel par sa surface.

- Ve est le volume d'élution d'une substance, mesuré entre le temps t_o (tel que nous l'avons défini) et l'instant d'apparition du sommet du pic correspondant à cette substance. Ve est indépendant de la vitesse d'élution, de la concentration de la substance dans l'échantillon et de la température, ceci pour une molécule donnée et une colonne donnée.

- Vo est le volume mort d'une colonne, c'est-à-dire, le volume du liquide situé entre les grains du gel. On l'obtient en mesurant le volume d'élution d'une substance complètement exclue. Nous employons le bleu dextran 2000. Nous plaçons au sommet de la colonne 1 ml d'une solution de bleu dextran à 0,1 % dans le tampon d'élution. Cette substance possédant un maximum d'absorption vers 280 mμ est détectée par l'absorptiomètre en continu. Pour confirmer les résultats, nous recueillons de très petites fractions (0,8 ml) sur le collecteur. Nous passons ces fractions au spectrophotomètre à 280 mμ.

- $Kav = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$, paramètre dû à LAURENT et KILLANDER (133), permet de comparer les résultats expérimentaux. De mesure aisée, il est indépendant de la géométrie de la colonne et du tassement du gel. On pourrait employer des paramètres qui font appel à Vi (volume interne des grains du gel), mais ils sont d'un emploi plus aléatoire, car Vi est difficile à mesurer avec précision.

- Estimation des poids moléculaires. Nous employons des protéines de référence, de poids moléculaires connus; nous opérons comme pour les lyophilisats. Pour une colonne donnée, nous appliquons la formule (262) :

$$\frac{Ve}{Vo} = K \log M$$

- Importance des diverses fractions. Le calcul des pourcentages des fractions protéiques se fait en mesurant les surfaces des pics. Ceux-ci sont décalqués sur une feuille de bristol d'épaisseur régulière, découpés et pesés.

6) Choix des gels

La chromatographie en couche mince nous a guidé dans le choix des gels pour la colonne. Outre le G-100, nous avons cependant dû employer le G-75 afin de comparer nos résultats avec ceux d'autres auteurs. Les résultats confirment la supériorité du G-100 pour l'étude de nos extraits.

II - ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE GELATINEUX

L'électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose s'est développée depuis les travaux de KOHN (126)(127), supplantant, en biologie clinique, l'électrophorèse sur papier.

Cette technique possède des avantages; elle ne nécessite que de faibles échantillons, la résolution est bonne et la séparation est rapide. Le support montre peu d'affinité chimique pour les protéines, il peut être complètement transparisé ou aisément dissous.

Nous avons essayé plusieurs types commerciaux d'acétate de cellulose et avons choisi un acétate de cellulose gélatineux (*). Il nous a donné satisfaction du point de vue analytique, et présente l'avantage d'être éventuellement livré en blocs permettant des séparations préparatives.

L'acétate de cellulose gélatineux est fabriqué par un procédé à chaud, comme les gels d'agar. Fluide à chaud, dans un mélange convenable de solvants, il se solidifie par refroidissement. Il est gélatineux, car il conserve l'état hydraté, ce qui lui donne une structure tridimensionnelle. Il est livré en bandes ou en blocs dans une solution de méthanol à 35 %, et ne doit pas être laissé à l'air pour éviter sa dessication.

La porosité de l'acétate de cellulose gélatineux est de 0,45 µ. On peut donc penser que dans notre cas particulier, il n'y a pas d'effet de filtration moléculaire.

(*) Cellogel : Chemetron, Milan, Italie.

L'utilisation de ce support pour l'étude des protéines sériques est bien standardisée. Son affinité chimique pour ces protéines est nulle (DI CAMPO - 42).

Pour les protéines tissulaires, son emploi est beaucoup moins développé, et nous avons dû faire de nombreux essais aussi bien pour l'électrophorèse analytique que pour l'électrophorèse préparative.

A - ELECTROPHORESE ANALYTIQUE

Nous employons une cellule de KOHN (*) classique et un générateur permettant de travailler sous tension constante. Les divers temps de l'opération seront indiqués en détail.

- Préparation des bandes et tampons

Les bandes employées ont 17 cm de long sur 2,5 ou 4 cm de large. Leur épaisseur est de 300 µ ou 500 µ, mais ces dernières nous ayant donné les meilleurs résultats, nous avons abandonné les 300 µ.

Les bandes, conservées en bac plastique dans une solution de méthanol à 35 %, sont prélevées au moment de l'emploi et posées sur la surface du tampon d'électrophorèse contenu dans un récipient approprié. Elles flottent puis s'y enfoncent tout en s'imbibant. Nous évitons ainsi d'éventuelles inclusions d'air.

Après 15 minutes d'immersion, les bandes sont retirées et pour éliminer l'excès de tampon, elles sont placées entre deux feuilles de papier-filtre légèrement pulvérisé avec du tampon (7) et soumises à la pression légère d'un rouleau de caoutchouc. Le risque de dessication est ainsi écarté.

(*) Cuve Modèle II - Shandon, Londres.

Des essais ont été effectués avec plusieurs tampons de pH 9,7 à 3,7 et d'une force ionique voisine de 0,1 (voir plus loin les détails); les meilleurs résultats ont été obtenus avec un tampon Tris-glycine de composition :

Tris	3 g	pH 8,5
Glycine	14,4 g	μ 0,1
H_2O	q.s.p. 1000 ml	

Avec les tampons de force ionique 0,05, les fractions sont moins bien individualisées.

- Dépôt de l'échantillon et électrophorèse

Les bandes d'acétate de cellulose, imbibées de tampon, sont rapidement placées dans la cellule, la surface mate en haut. Elles sont bien appliquées sur les épaulements prévus à cet effet.

Les extrémités des bandes plongent dans le tampon des bacs à électrodes dont les niveaux ont été soigneusement égalisés; une distance de 2 cm entre les bandes d'acétate et la surface du tampon a été choisie. La distance entre les épaulements (c'est-à-dire, le pont d'électrophorèse) est de 10 cm

Nous employons toujours deux bandes de garde, l'une à gauche, et l'autre à droite des bandes de travail. Nous n'y déposons pas d'échantillon. La cuve est ainsi mieux saturée et cela évite des phénomènes de distorsion.

Les échantillons sont déposés à l'aide d'un capillaire calibré (*); la pénétration est assez lente. Nous déposons généralement de 3,5 à 5,5 µl correspondant à 50 µg de protéines. Le dépôt de 10 mm de large sur 1 mm d'épaisseur se fait à 4 cm du centre de la bande d'acétate vers la cathode. Les bandes de 2,5 cm et de 4 cm de large permettent respectivement le fractionnement d'un échantillon et de deux échantillons en parallèle.

La cellule est fermée et l'électrophorèse est conduite sous 150 V

(*) Microcap, Drummond,U.S.A.

pendant 1 h 15 à 1 h 30, ce qui donne une longueur de migration de 5 à 6 cm. L'intensité dépend évidemment du tampon employé.

Au début de nos essais, avant de déposer l'échantillon, nous mettions tout le système électrophorétique en équilibre sous 75 V pendant 30 minutes, mais nous avons abandonné cette pratique qui n'améliore pas la séparation électrophorétique.

- Fixation, coloration, décoloration, transparisation et conservation

A la fin de l'électrophorèse, les bandes sont prélevées et plongées pendant 30 minutes dans un bain colorant et fixant de noir amide de formule :

Noir amide		1 g
Méthanol		100 ml
Acide acétique cristallisable		20 ml
Eau distillée	q.s.p.	200 ml

Elles sont ensuite décolorées par immersion pendant 30 minutes dans quatre bains successifs de la solution :

Méthanol		500 ml
Acide acétique cristallisable		100 ml
Eau distillée	q.s.p.	1000 ml

Coloration et décoloration se font sur agitateur à bascule. Les solutions de décoloration sont rejetées après six emplois.

Nous avons tenté des colorations au coomassie. L'électrophorégramme n'est pas amélioré et le fond de la bande reste toujours légèrement teinté. Avec le noir amide, la décoloration est parfaite.

A la sortie du dernier bain de décoloration, l'électrophorégramme doit être immergé pendant quelques minutes dans une solution aqueuse d'acide acétique à 10 % et conservé dans une solution aqueuse du même acide à 5 %.

Nous avons transparisé certains de nos électrophorégrammes, ce qui permet de les conserver à sec et de les densitométrer par transmission. Pour

cela, les bandes traitées et décolorées sont déshydratées pendant 1 minute dans un bain de méthanol puis plongées pendant 2 minutes dans une solution de transparisation ainsi composée :

Méthanol	87 ml
Glycérol	1 ml
Acide acétique cristallisable q.s.p.	100 ml

Les bandes, retirées de ce dernier bain, sont égouttées et soigneusement appliquées sur une lame de verre à laquelle elles doivent adhérer par toute leur surface. On élimine l'excès de liquide de transparisation et l'on porte à l'étuve à + 60° C jusqu'à transparisation complète. La plaque, retirée de l'étuve, est retournée sur un papier filtre, pendant le refroidissement, ce qui empêche la déformation des bandes. On peut alors décoller les films transparents de la plaque de verre.

Les deux solutions utilisées doivent être renouvelées après deux utilisations.

Il faut noter qu'après traitement, les bandes sont plus courtes de 5 mm.

- Estimation des électrophorégrammes

Nous comparons les électrophorégrammes obtenus dans les mêmes conditions. Nous n'avons pas mesuré les mobilités, car il eut été nécessaire d'estimer le flux d'électro-osmose parfois assez important sur acétate de cellulose.

Nous avons densitométré les électrophorégrammes, soit par transmission sur les bandes transparisées, soit par réflexion sur les bandes non transparisées ou transparisées (128), sans chercher à estimer les surfaces des différentes fractions.

B - ELECTROPHORESE PREPARATIVE

La cellule d'électrophorèse et le générateur sont les mêmes que pour la méthode analytique. Les diverses opérations sont sensiblement identiques.

- Préparation des bandes et tampons

Les blocs d'acétate de cellulose gélatineux, d'une largeur de 3 cm et d'une épaisseur de 2,5 mm, sont ajustés à une longueur de 12 cm. Ils ont le même degré de gélatinisation que les bandes mais une porosité plus grande, car ils doivent fonctionner comme une éponge afin de permettre la récupération des fractions (42).

Les blocs, conservés de la même façon que les bandes, sont plongés dans le tampon pendant 2 h 30. L'excès de tampon est ensuite éliminé. Sur la ligne de dépôt de l'échantillon, on effectue une série de petits trous d'aiguille.

Le tampon employé est le Tris-glycine précédemment décrit.

- Dépôt de l'échantillon et électrophorèse

Les blocs sont déposés sur les épaulements de la cellule. Le contact avec le tampon est obtenu à l'aide de deux languettes de papier Whatman 3 MM. Nous employons toujours deux blocs de garde, comme dans la méthode analytique. Le pont d'électrophorèse est donc de 12 cm.

L'échantillon est déposé sur la ligne de départ à 3 cm du centre de la bande, vers la cathode. Les trous d'aiguille facilitent grandement sa pénétration. Nous avons déposé des volumes d'échantillons correspondant à 300 ou 600 µg de protéines, sur une largeur de 2 cm. La cellule est fermée, et l'électrophorèse est conduite sous 200 V pendant 3 h 30. L'intensité ne

dépasse pas 0,55 mA/cm. Nous n'avons pas jugé nécessaire de refroidir la cellule.

- Repérage et récupération des fractions

Chaque bloc est sorti de la cellule et déposé sur une plaque de verre. Pour repérer les fractions, nous prenons une empreinte de l'électrophorégramme. Pour cela, une bande d'acétate de cellulose gélatineux de 300 µ d'épaisseur, imbibée de tampon, puis essorée est appliquée sur le bloc. L'adhérence qui doit être parfaite est obtenue en faisant rouler sur la bande un tube à essai. Après 3 minutes de contact, la bande est fixée et colorée au noir amide pendant 2 minutes, puis décolorée par trois bains successifs de 3 minutes.

Bande et bloc sont placés côte à côte et les fractions sont séparées les unes des autres à l'aide d'un scalpel. On obtient ainsi une série de parallélépipèdes qui sont chacun placé dans le corps d'une seringue de 1 ml. On les comprime à l'aide du piston et on recueille les diverses fractions dans des micro-tubes à essais dans une proportion voisine de 90 %.

- Conservation

Les microtubes sont introduits immédiatement dans des flacons type pénicilline et lyophilisés pendant 7 heures.

III - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

L'électrophorèse de zones effectuée à l'aide d'acétate de cellulose de gélose ou de papier a un pouvoir séparateur limité; l'emploi de certains gels permet une meilleure résolution.

Les gels d'amidon, étudiés dès 1955 par SMITHIES (231), révèlent, notamment celui à 15 %, un pouvoir de résolution remarquable, encore amélioré par l'emploi d'un système de tampons discontinu imaginé par POULIK (192). En 1959, SMITHIES (232) a amélioré sa technique, et en 1961, MOURAY, MORETTI et FINE (164) ont mis au point une micro-méthode.

Le gel d'amidon, constituant un réseau de mailles, qui "filtre" les molécules selon leurs dimensions, permet de séparer des protéines ayant des charges identiques ou voisines, mais de dimensions différentes, ce que ne peut réaliser l'électrophorèse de zones classique, où la migration dépend seulement des charges électriques.

Divers auteurs ont tenté de remplacer le gel d'amidon par un gel synthétique, ayant de plus larges possibilités d'emploi. Ils ont donné la préférence au gel de polyacrylamide sur lequel nous nous étendrons.

Notre travail était en cours, lorsque nous avons eu connaissance d'un nouveau milieu. En effet, URIEL (256)(257), en 1966, a mis au point un gel formé d'acrylamide et d'agarose, ayant toutes les propriétés des gels de polyacrylamide et de meilleures propriétés mécaniques.

Les solutions d'acrylamide et d'agarose sont mélangées. La polymé-

risation de l'acrylamide est obtenue à l'aide d'un catalyseur et à une température supérieure à celle du point de gélification de l'agarose. On abaisse ensuite la température et l'agarose gélifie entre les mailles du gel de polyacrylamide. Des concentrations en acrylamide de 3 à 9 % permettent le fractionnement de la plupart des mélanges protéiques.

L'auteur coule des plaques qui, après polymérisation, sont longuement lavées dans le tampon d'électrophorèse et peuvent être conservées dans ce tampon pendant plusieurs semaines avant utilisation.

L'électrophorèse est menée sur la plaque disposée horizontalement. Des réservoirs de départ sont obtenus à l'emporte-pièce et remplis d'un mélange échantillon-agarose.

L'auteur emploi le plus généralement un système de tampons discontinu dont il mesure soigneusement les conductivités.

Après coloration, les électrophorégrammes sont décolorés par électrophorèse, puis séchés.

A - METHODES D'ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

ORNSTEIN (174) et RAYMOND (209) ont proposé, en 1959, un gel de polyacrylamide. Celui-ci, thermostable, transparent, solide, non ionique, possède une certaine inertie chimique. La dimension des pores du gel dépendant de la concentration du monomère, on peut préparer des gels adaptés aux problèmes posés. Les produits de base sont l'acrylamide (*) et le N, N'-méthylène bisacrylamide (Bis) (**). On ajoute un catalyseur et un accélérateur de polymérisation au moment de la préparation.

(*) $CH_2 = CH-CO-NH_2$

(**) $CH_2 = CH-CO-NH$ ⟩ CH_2
$CH_2 = CH-CO-NH$ ⟩

Aux U.S.A., se sont développées deux méthodes d'électrophorèse verticale en gel de polyacrylamide, celle de RAYMOND et celle de ORNSTEIN et DAVIS, différant dans leur principe et dans les modalités opératoires. Cette seconde méthode a donné lieu à diverses simplifications.

a - Méthode de RAYMOND

RAYMOND (210)(208) prépare les gels avec du Cyanogum 41 (*) dissous dans un tampon approprié (Tris-EDTA-Borate, par exemple). Il polymérise à l'abri de l'air; il utilise le persulfate d'ammonium comme catalyseur, et le diméthylaminopropionitrile comme accélérateur. Le gel est coulé en plaques rectangulaires disposées verticalement. A l'extrémité supérieure de la plaque, on aménage de petites cavités destinées à recevoir les échantillons protéiques purs ou additionnés de glucose, selon la densité.

L'auteur maintient constants les divers paramètres de l'électrophorèse : gel uniforme, température, concentration et pH. Il rejette le système de tampons discontinu. Enfin, après avoir laissé l'équilibre s'établir dans l'appareil sous tension pendant vingt minutes, il dispose dans les cavités les échantillons à étudier. La migration parallèle des divers échantillons sur la même plaque rend aisées les comparaisons.

L'auteur insiste sur l'intérêt de l'électrophorèse à deux dimensions (Orthacryl), un changement de composition du gel ou du tampon, lors de la deuxième migration, pouvant faire apparaître certaines caractéristiques physiques des molécules protéiques.

b - Méthode de ORNSTEIN et DAVIS ou "Disc électrophorèse"

Au lieu d'une plaque verticale unique, ORNSTEIN et DAVIS (175)(31)(32) utilisent de petits tubes de verre. Ils font varier la nature du gel, celle des tampons et les conditions de pH, créant ainsi des "discontinuités" dans la matrice électrophorétique, d'où le nom de la méthode.

(*) Produit de l'American Cyanamid Co. C'est un mélange d'acrylamide et de Bis.

Nous avons présenté cette méthode dans une publication (153) relative à son application à l'étude des protéines solubles des muscles adducteurs de divers Lamellibranches (155), aussi nous contenterons-nous d'en rappeler le principe.

Au cours des électrophorèses en général, le temps élevé de migration favorise les phénomènes de diffusion. Les bandes s'étalent et leurs limites deviennent imprécises. Il est donc intéressant de réduire ce temps, mais l'épaisseur de la zone de départ est un facteur qui restreint considérablement cette possibilité. Une bonne séparation, en un temps court, pourra être réalisée en diminuant cette épaisseur.

Un choix raisonné de tous les constituants des gels et des tampons permet, en "disc électrophorèse" de concentrer les échantillons protéiques et d'affiner considérablement la zone de départ.

La migration électrophorétique elle-même demande l'établissement d'un champ relativement homogène. Cette condition est réalisée par une discontinuité du pH, et par une discontinuité des pores du gel en un point de la colonne.

Les colonnes de gel sont formées de 3 couches successives :

- le "sample gel", où l'échantillon est mélangé à un gel extrêmement poreux qui est un simple milieu anticonvectionnel,
- le "stacking gel" où s'effectue la concentration des protéines en une très mince zone de départ,
- le "separating gel" où s'effectue la séparation des protéines, la concentration des constituants de ce gel étant ajustée aux dimensions des protéines à séparer.

A une discontinuité des pores des différents gels, se superpose une discontinuité dans le pH des divers tampons. Les constituants et les pH de ces tampons sont choisis de façon qu'à l'électrophorèse, il se forme une

frontière mobile avec rupture de l'homogénéité du champ électrique (valeur faible en avant de la frontière, valeur élevée en arrière). Il en résulte une concentration des protéines en une zone très mince.

c - Méthodes simplifiées

De nombreux chercheurs ont tenté de simplifier la méthode de ORNSTEIN et DAVIS.

Tous les auteurs sont d'accord sur la possibilité de supprimer le "sample gel", à la condition d'augmenter la densité de l'échantillon avec du saccharose.

Le "stacking gel" peut être remplacé ou même supprimé. MICHL et PASTUSZYN (149) retiennent la particularité que la partie supérieure du "separating gel" est plus poreuse que la partie inférieure, du moins lorsque l'on n'emploie pas "l'upside down technique" (32). Ils suppriment donc le "sample gel" et le "stacking gel" et déposent directement l'échantillon sur le "separating gel". Ils laissent les protéines diffuser dans la partie supérieure très poreuse et pratiquent ensuite l'électrophorèse.

Dans la formule des "sample et stacking gels", BROOME (18) remplace l'acrylamide et le Bis par du Sephadex G-200.

CLARKE (25) trouve indésirable l'emploi du "stacking gel" comme celui du "sample gel". Il mélange l'échantillon à une solution d'urée ou de saccharose et il élimine les éventuels mélanges mécaniques en utilisant un fragment de coton. On trouve ainsi superposés dans le tube de migration : le gel, l'échantillon mélangé à une solution de saccharose, de l'électrolyte et un fragment de coton.

RAYMOND (208) et URIEL (256) déclarent inutile le "stacking gel" et considèrent qu'il suffit que le réservoir de départ soit rempli "avec le mélange des protéines dans un milieu tel que leur mobilité électrophorétique soit plus grande que dans le gel lui-même". TOMBS (245) est du même avis.

La vitesse de migration est bien plus grande en solution libre que dans les gels de polyacrylamide, donc toutes les protéines se concentreront à l'interface gel/liquide et ceci en une très mince zone de départ.

Rappelons que SMITHIES (232) admet que le haut pouvoir de résolution de sa méthode d'électrophorèse en gel d'amidon dépend, pour une part, du rapport de la mobilité des protéines dans la fente de départ et dans le gel; ce rapport conditionne la finesse de la zone de départ.

B - METHODE ADOPTEE POUR L'ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

L'excellente méthode d'ORNSTEIN et DAVIS, que nous continuons d'employer, présente certaines difficultés opératoires et sa mise en oeuvre est très longue. Nous avons adapté à nos problèmes une méthode plus rapide qui dérive des diverses simplifications proposées.

Dans la méthode que nous employons, le "sample gel" et le "stacking gel" sont supprimés; l'échantillon dont on a augmenté la densité par adjonction de saccharose est déposé directement sur le "separating gel". Le système-tampon employé est discontinu.

Nous pensons que l'emploi d'un système tampon discontinu choisi avec soin, et permettant l'établissement d'une frontière mobile stable avec conductivité plus faible en arrière de la frontière qu'en avant de celle-ci ne peut que contribuer à amincir la zone de départ. HJERTEN, JERSTEDT et TISELIUS (95) indiquent une autre façon d'amincir la zone qui est de se servir d'un système-tampon continu et de donner à l'échantillon une plus faible conductivité que celle du tampon.

Nous allons décrire la méthode retenue pour nos recherches. La figure 15 indique pour chaque opération le matériel et schématise la technique.

Solutions - Stock	Solution de travail	Fabrication du gel	Electrophorèse	Fixation - Coloration	Décoloration	Conservation
1 - A ou A' 2 - C_n ou C' 3 - H_2O 4 - G	(1+2+3+4) cf. Tab XIX	1 et 2 : Mise en place 3 : Polymérisation a - Tube de verre b - Bouchon eau Solution Gel	1 - Générateur 2 - Bacs circulaires 3 - Support 4 - Tubes de migration 5 - Baguette d'obturation	1 - Disque tournant 2 - T.E. 10 x 100	1 - Cuve (coupe) 2 - Feuilles de polyethylene poreux 3 - Colonnes de gel	
1 2 3 4		1 2 a b 3	5 2 4 1 2 3	2 1	OU 2 3 2 + - 1	
Temps opératoires nombre de tubes : 12 Coloration au noir amide Decoloration transversale		1 et 2 : 20' 3 : 30'	40'	60'	20'	
		N.B. Ces chiffres ne tiennent pas compte des temps morts.				

Figure 15.- Electrophorèse en gel de polyacrylamide : Matériel et méthode.

- Cellule d'électrophorèse et générateur

La cellule, identique à celle que nous employons en "disc électrophorèse" (*), est composée de deux bacs à électrode, de forme circulaire, placés sur un support, l'un au-dessus de l'autre.

Deux orifices, munis de joints souples d'étanchéité, sont également répartis sur une circonférence, au fond du bac supérieur. Les colonnes de migration, préparées dans des tubes de 65 mm de long et de 5 mm de diamètre intérieur, y sont insérés. Les orifices inemployés sont bouchés par des baguettes d'obturation en matière plastique.

Les bacs sont remplis de tampon, le niveau est règlé pour permettre à l'extrémité inférieure des tubes de plonger dans le liquide.

Les électrodes sont reliées à un générateur pouvant travailler à intensité constante, condition nécessaire pour obtenir de bons résultats.

- Préparation des tubes de migration

Les tubes de migration, en verre, sont passés au mélange sulfochromique, rincés et séchés à l'étuve. Ils sont ensuite immergés 5 minutes dans de l'eau distillée, égouttés puis plongés 15 minutes dans un détergent concentré. On les laisse sécher toute la nuit, en position verticale, à la température ambiante.

Ce traitement est important et conditionnera la confection correcte du gel. Après avoir essayé plusieurs détergents du commerce, nous utilisons le "Column-coat" (**).

Des tubes calibrés sont marqués en série à l'aide d'une règlette spéciale. Un trait situé à 1 centimètre du bord supérieur du tube indique

---

(*) Model 12 Apparatus : Canalco Bethesda Md. U.S.A.
(**) Canalco Bethesda Md. U.S.A.

le niveau que doit atteindre le gel; à 2,5 centimètres du premier, un second trait permet de situer la fin de la migration électrophorétique.

Les tubes sont munis de bouchons de caoutchouc spéciaux à leur partie inférieure et alignés sur un portoir en position bien verticale.

- Préparation des colonnes de gel

Les gels sont confectionnés à partir de solutions-stock, gardées constamment à + 4° C. Les volumes de solution nécessaires à l'expérience sont sortis du réfrigérateur et on les laisse s'équilibrer avec la température à laquelle se déroulera l'expérience.

Avec ces solutions-stock, on confectionne la solution de travail qui est immédiatement répartie dans les tubes de migration, jusqu'au niveau du trait supérieur, à l'aide d'une grosse pipette Pasteur.

La solution doit couler régulièrement le long de la paroi intérieure afin de ne pas emprisonner de bulle à la partie inférieure du tube de migration. Cette bulle, lorsqu'elle se produit, reste au bas de la colonne ou remonte à la surface, avant le début de la polymérisation, réduisant d'autant la longueur du gel et rompant son homogénéité.

La mise en place de la solution doit être très rapide. Immédiatement, dans chaque colonne, on recouvre la solution d'une couche d'eau distillée, d'environ 2 millimètres d'épaisseur. On se sert d'une seringue munie d'une aiguille très fine dont l'extrémité doit rester en contact avec la paroi intérieure du tube de migration. Cette paroi, rappelons-le, a été au préalable traitée avec un détergent concentré, ce qui permet un écoulement très régulier de l'eau. Il faut éviter tout mélange eau-solution. Cette couche d'eau permet d'obtenir une surface de gel très plate.

La polymérisation a lieu à l'abri de la lumière et demande 30 minutes.

Les tubes contenant les colonnes de gel sont débarrassés, par retournement, de l'eau et du faible volume de solution non polymérisé. En effet, la surface de la solution en contact avec l'eau distillée ne polymérise pas; aussi la hauteur effective du gel est toujours inférieure de 2 millimètres à la hauteur de la solution de travail.

La surface des gels est lavée par deux fois à l'eau distillée, avec une seringue, puis séchée à l'aide de mèches de papier Joseph.

- Mise en place des colonnes de gel sur la cellule

Le bac supérieur de la cellule d'électrophorèse est équipé de ses baguettes d'obturation. On y verse ainsi que dans le bac inférieur 1 litre de tampon.

Les tubes présentant une bulle à leur partie inférieure ou une hauteur de gel au-dessous de la normale ou encore des inhomogénéités sont écartés.

On enlève les bouchons inférieurs des tubes avec précaution afin d'éviter un effet de succion qui abimerait les gels.

On insère les tubes de migration dans les joints d'étanchéité de la cuve supérieure en retirant prudemment les baguettes d'obturation. La capacité de la cuve est de 12 tubes. Si l'on travaille sur un nombre inférieur de tubes, on laisse en place les baguettes d'obturation sur les joints d'étanchéité inemployés. Les tubes doivent dépasser de 1 centimètre le niveau supérieur des joints.

On chasse à l'aide d'une seringue l'air qui s'est accumulé dans la partie supérieure des tubes et l'on crée une goutte pendante de tampon à l'extrémité inférieure. De ce fait, le contact électrique sera franc.

La cuve inférieure est mise en place de façon que les tubes de migration baignent sur une longueur de 1 centimètre.

- Préparation et mise en place des échantillons

Pendant la polymérisation, on prépare les échantillons à soumettre à l'électrophorèse. La densité de l'échantillon, que l'on doit remettre en solution, s'il est lyophilisé, est augmentée par adjonction de saccharose (25 milligrammes par millilitre). A l'aide d'une pipette Pasteur très effilée, on y ajoute une microgoutte de solution aqueuse de bleu de bromophénol à 0,005 %. Ce colorant migrera avec le front mobile qui se développe lors de l'électrophorèse et permettra de suivre la migration.

On dépose, dans chaque tube de migration, un certain volume d'extrait à l'interface gel/tampon. L'applicateur est une seringue de 1 millilitre munie d'un cathéter en polyéthylène de 60 millimètres de long et de 1,14 millimètre de diamètre intérieur. Ceci représente un volume de 1 µl par millimètre. On remplit le cathéter sur une longueur, en millimètre, correspondant au nombre de microlitres désiré. On introduit le cathéter dans le tube de migration de façon que son extrémité effilée soit à 2 millimètres du niveau supérieur du gel. On pousse doucement et régulièrement le piston de la seringue et l'échantillon plus dense que le tampon, se dépose à la surface du gel.

- Electrophorèse

Les électrodes sont mises en place et le générateur est mis sous tension.

On affiche 1 milliampère par colonne de gel, pendant 15 minutes. Les protéines migrent librement jusqu'à la surface du gel et la faiblesse du courant minimise d'éventuels mouvements de convection par effet Joule (mouvements de convection contrariés d'ailleurs par la densité de l'échantillon). On affiche ensuite 2,5 milliampères par colonne, et l'on arrête l'électrophorèse lorsque le ménisque de bleu de bromophénol (frontière mobile) a atteint la marque inférieure tracée sur le tube de verre.

Il est nécessaire de travailler avec un générateur permettant de

maintenir l'intensité constante malgré les variations de résistance qui peuvent se produire dans la cellule d'électrophorèse. Les gels de polyacrylamide présentent un point bien particulier : la résistance du gel augmente au cours de l'électrophorèse. En travaillant avec un générateur permettant de maintenir constante la tension, l'intensité diminue graduellement, la durée de l'électrophorèse doit être accrue, augmentant ainsi les dangers de diffusion. En travaillant à intensité constante, la tension augmentera en fonction de la résistance du gel.

La figure 16 montre les variations de la tension que nous pouvons lire, en fonction du temps, sur les cadrans du générateur.

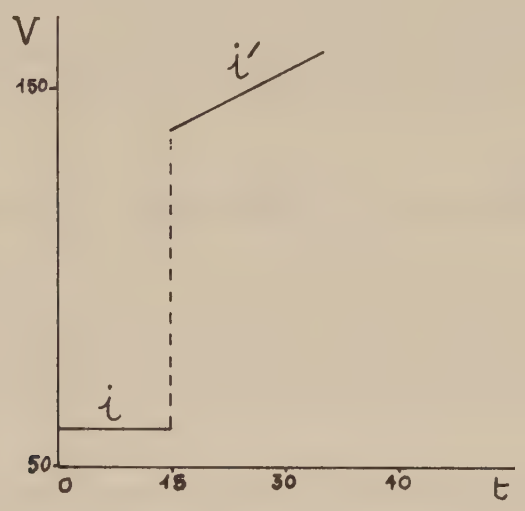


Figure 16.- Variation de la tension en fonction du temps au cours d'une électrophorèse
- Système tampon de ORNSTEIN et DAVIS
- Intensité constante : i=11mA; i'=22mA

L'expérience nous a montré qu'une migration à 2,5 milliampères par colonne est préférable à une migration à 5 milliampères par colonne.

- Fixation et coloration des électrophorégrammes

Le générateur est mis hors-circuit, le réservoir inférieur est déposé et les tubes de migration retirés des joints d'étanchéité sont rem-

placés par les baguettes d'obturation.

Les gels sont immédiatement extraits des tubes de verre. Une seringue de 10 millilitres, munie d'une aiguille 30-9 dont on a coupé le biseau, est remplie d'eau distillée. On introduit l'aiguille entre le gel et la paroi du tube de migration. En suivant la surface intérieure du tube, on décolle le gel tout en injectant de l'eau. Tout ceci doit se pratiquer à la partie inférieure du gel qui ne contient pas de fractions protéiques. La colonne de gel glisse doucement hors du tube de verre et on la reçoit dans le bain de fixation ou de coloration-fixation.

Fixation et coloration se pratiquent dans de petits tubes à essais bouchés et placés suivant les rayons d'un disque rotatif de 20 cm de diamètre, incliné de 30 degrés sur la verticale et tournant à la vitesse de 10 tours/minute. Les temps opératoires varient suivant le mode de coloration.

- Décoloration et conservation des électrophorégrammes

La décoloration peut se faire dans des solutions aqueuses d'acide acétique en bains prolongés ou par décolorations électrophorétiques dans un champ électrique parallèle à l'axe de la colonne de gel ou normal à cet axe.

Les électrophorégrammes sont conservés dans des tubes à essais remplis d'une solution aqueuse d'acide acétique à 7 %. Nous faisons en sorte qu'il y ait toujours des traces de colorant dans cette solution afin que l'équilibre ne soit pas rompu au détriment du colorant fixé sur les protéines.

- Estimation qualitative et semi-quantitative des électrophorégrammes

La comparaison des électrophorégrammes est aisée bien que l'usage de plaques telles que celles employées par RAYMOND soit peut-être plus pratique. Il faut cependant faire une restriction pour les colonnes de gel obtenues à l'aide de solutions de concentrations différentes en acrylamide; plus la concentration est élevée, plus les gels augmentent de volume; nous reviendrons sur ce point à propos des cas particuliers.

Nous exprimons la mobilité des différentes fractions par le rapport suivant :

$$R_r = \frac{\text{déplacement de la fraction étudiée}}{\text{déplacement de la fraction la plus rapide}}$$

La mesure semi-quantitative de l'importance relative des fractions se fait par transmission, à l'aide du "Chromoscan" muni d'un objectif de microscope x 20 placé entre l'échantillon et le photomultiplicateur. La fente employée est très fine (0,3 x 1 mm). Le filtre est approprié au colorant employé. L'intégration est automatique.

C - ADAPTATION DE LA METHODE A QUELQUES CAS PARTICULIERS

Nous venons d'exposer dans ses grandes lignes la méthode que nous avons adoptée et dont le petit appareillage a été réalisé au Laboratoire.

Pour résoudre nos problèmes particuliers, nous avons été amenés à étudier les effets de divers facteurs, ce qui nous a conduit au choix final d'une technique plus adaptée.

1°) Influence des tampons et des gels

Nous avons expérimenté deux systèmes tampons discontinus déjà employés en disc électrophorèse classique.

- l'un mis au point par ORNSTEIN et DAVIS (175)(32) sera appelé système-tampon I,
- l'autre mis au point par WILLIAMS et REISFELD (264) sera dénommé système-tampon II.

Pour chaque système-tampon, nous avons essayé des gels à diverses concentrations.

a - Les systèmes-tampons employés

Leurs formules et leurs caractéristiques, que nous avons mesurées, sont rassemblées dans le tableau XVIII.

Le Temed, inclus dans ces tampons, est un accélérateur qui joue son rôle lors de la confection des gels. On peut remarquer que le volume employé dans le système tampon II est le double de celui du système tampon I.

Pour obtenir pH 7, dans le tampon des bacs du système II, nous avons dû abaisser la quantité de Tris. En effet, la formule de WILLIAMS et REISFELD comporte en fait 1 gramme de ce produit, mais cela amène à un pH de 7,5.

Il est intéressant de remarquer que les tampons à base de Tris ont leurs pH très sensibles aux variations de température.

Nous avons donc à notre disposition deux systèmes-tampons dont les pH sont différents (voir tableau XVIII).

b - Les gels

Les gels sont préparés en utilisant :

- une solution du monomère et du co-monomère : acrylamide et N, N'-méthylène-bisacrylamide,
- une solution d'un catalyseur : le persulfate d'ammonium,
- un accélérateur de polymérisation : le Temed (N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylenediamine) déjà inclus dans les solutions tampons A et A'.

En faisant varier la quantité du monomère, et dans une certaine mesure du co-monomère, on peut fabriquer des gels dont le diamètre moyen des pores variera en conséquence. Nous reproduisons dans la figure 17 une courbe donnant la taille des pores des gels en angström en fonction du

TABLEAU XVIII

Systèmes - tampons utilisés

	Système tampon I	Système tampon II
Tampons des Bacs	TRIS 3,0 g Glycine 14,4 g H_2O q.s.p. 1.000 ml - (0,19 M en glycine, 0,025 M en TRIS) - pH 8,3 à + 18°C - conductivité 0,435 mMho cm^{-1} à + 18°C - employé non dilué	Veronal 5,52 g TRIS 0,40 g H_2O q.s.p. 1.000 ml -(0,030 M en Véronal, 0,0033 M en TRIS) - pH 7 à + 18°C - conductivité 0,154 mMho cm^{-1} à + 18°C - employé non dilué
Tampons des Gels	Solution-stock A HCl 1 N 48 ml TRIS 36,3 g Temed 0,23 ml H_2O q.s.p. 100 ml - (3 M en TRIS, 0,48 M en HCl) - pH 8,9 à + 18°C - conductivité 11,4 mMho cm^{-1} à + 18°C	Solution-stock A' HCl 1 N 48 ml TRIS 6,85 g Temed 0,46 ml H_2O q.s.p. 100 ml - (0,56 M en TRIS, 0,48 M en HCl) - pH 7,5 à + 18°C - conductivité 26 mMho cm^{-1} à + 18°C
	Ces solutions-stock seront mélangées, au moment de leur utilisation avec 7 volumes de solutions diverses.	
pH de migration	9,5	8

pourcentage d'acrylamide.

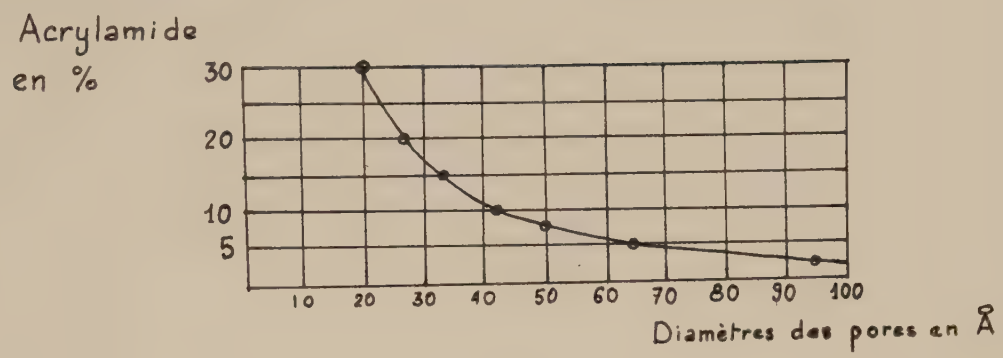


Figure 17.- Diamètres des pores du gel en fonction de la concentration en acrylamide. (Documentation CANALCO - 19)

Le gel à 7 % d'acrylamide est bien adapté à l'étude du sérum sanguin et des mélanges de protéines dont les poids moléculaires s'échelonnent entre 10^4 et 10^6, avec une résolution optimale pour la zone de poids moléculaires 30.000 - 300.000. Pour savoir si d'autres concentrations pouvaient nous apporter de meilleurs résultats, nous avons essayé des gels à 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 11%, 15% et 20% d'acrylamide, confectionnés selon des règles déjà bien établies (19). Les formules sont rassemblées dans le tableau XIX.

c - Les résultats obtenus

Système tampon I et gels à diverses concentrations en acrylamide.

Sur chaque colonne, nous déposons 35 µl d'un extrait de la partie transparente du muscle adducteur de *C. angulata* contenant 160 µg d'un mélange protéique. La durée de l'électrophorèse est de 35 minutes : 15 minutes à 1,5 mA par colonne et 22 minutes à 2,5 mA par colonne. La figure 18 rend compte des résultats obtenus.

Il est difficile de comparer bande pour bande les divers résultats car les longueurs de migration ne sont pas absolument les mêmes pour tous les gels. Par exemple, lorsque le front salin atteint la marque de 2,5 centimètres dans un gel à 7%, il se trouve légèrement au-dessous dans un gel

TABLEAU XIX

Formules des gels aux diverses concentrations

%	Å	Solutions stock	Gels
5%	64	Sol. C-5 Acrylamide 20 g Bis 0,735 g. H20 q.s.p. 100 ml	(A 1 vol. (C-5 2 " (H20 1 " + G 4 "
6%	60	Sol. C-6 Acrylamide 24 g Bis 0,735 g H20 q.s.p. 100 ml	(A 1 vol. (C-6 2 " (H20 1 " + G 4
7%	52	Sol. C-7 Acrylamide 28 g Bis 0,735 g H20 q.s.p. 100 ml	(A 1 vol. (C-7 2 vol. (H20 1 vol + G 4 "

Sol. A ou A' : Cf Tableau XVIII

Sol. G : Persulfate d'ammonium 0,14 g
H_2O q.s.p. 100 ml

Valables pour tous les gels ⟶

%	Å	Solution stock	Gels
8%	48		(A 1 vol. (C' 1,06 " (H20 1,94 " (+ G 4 "
9%	45		(A 1 vol. (C' 1,2 " (H20 1,8 " + G 4
11%	40	Sol. C' Acrylamide 60 g Bis 0,4 g H20 q.s.p. 100 ml	(A 1 vol. (C' 1,46 " (H20 1,54 " + G 4 "
15%	33		(A 1 vol. (C' 2 vol. (H20 1 vol. + G 4 vol.
20%	27		(A 1 vol. (C' 2,66 " (H20 0,34 " + G 4 "

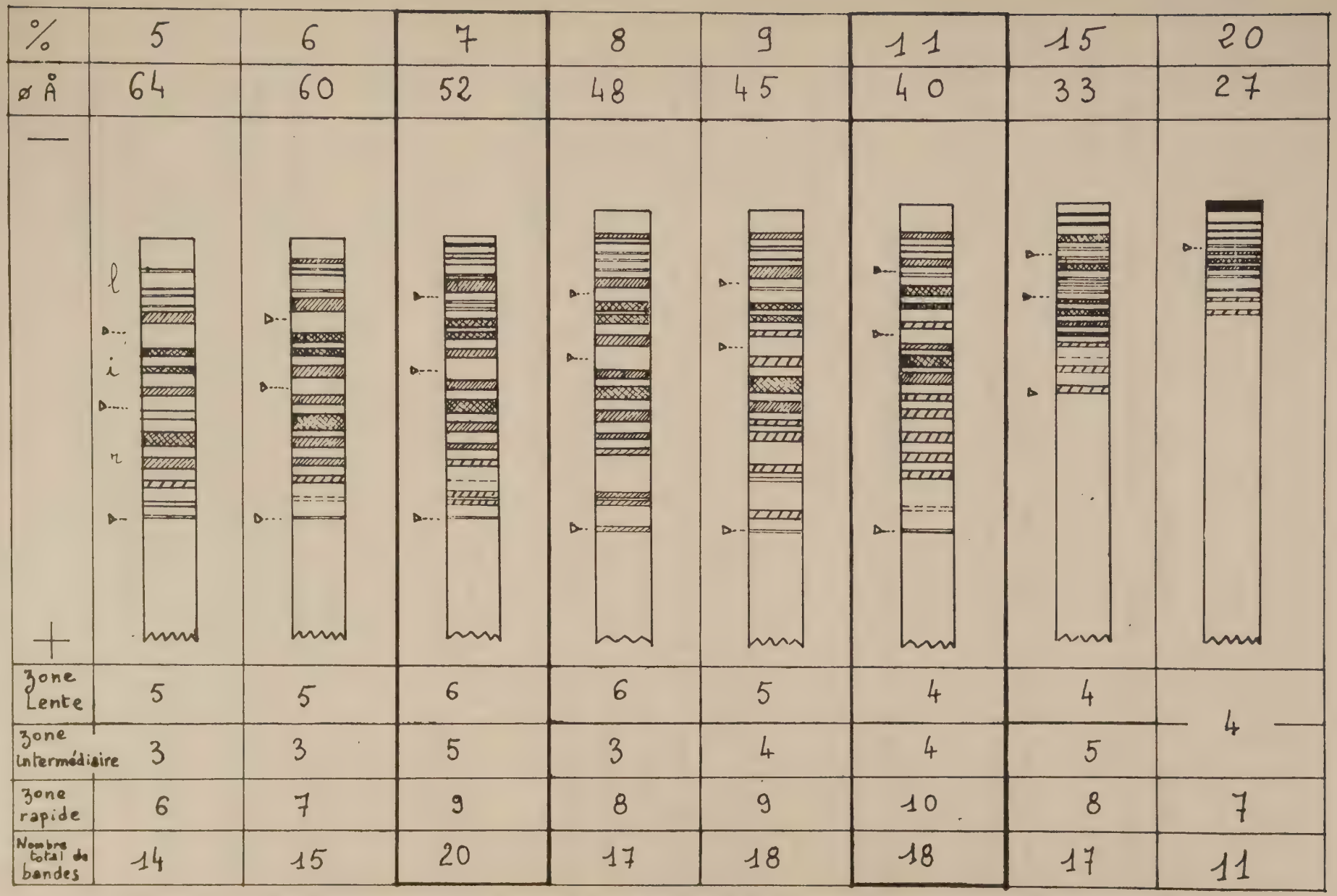


Figure 18.- Electrophorégrammes obtenus avec des gels à diverses concentrations en acrylamide. Système-tampon I. Extrait de la partie transparente du muscle adducteur de C.angulata.

à 9 %. De plus, certains gels gonflent à la coloration et au stockage, point sur lequel nous reviendrons.

Nous divisons donc l'électrophorégramme en 3 zones de mobilités différentes : rapide (r), intermédiaire (i), lente (l) et nous comparons ces zones d'un gel à l'autre.

La zone rapide est, dans le cas présent, limitée vers le bas par la bande la plus rapide et vers le haut par un groupe de 3 bandes très caractéristiques.

Cette zone prend de plus en plus d'importance au fur et à mesure que la concentration des gels augmente, et ceci jusqu'à 11 %. Elle diminue ensuite pour 15 % et 20 %.

Le groupe des 3 bandes caractéristiques se retrouve à toutes les concentrations. On remarque que leurs R_r sont, grossièrement, inversement proportionnels à la concentration des gels (de 5% à 11%). Entre ce groupe de 3 bandes et la bande la plus rapide, le nombre de bandes passe de 2 à 6 lorsque la concentration augmente de 5% à 11%. Ces bandes semblent se former aux dépens de la bande la plus rapide dont l'intensité de coloration diminue progressivement de 5% à 11%.

Ni dans la zone intermédiaire, ni dans la zone lente, on ne remarque de changements aussi importants. Mais, la meilleure résolution est, sans aucun doute, obtenue dans des gels à 7 %.

A toutes les concentrations, nous remarquons, à la surface supérieure du gel, une zone très colorée dont l'intensité n'est pas diminuée par l'augmentation des dimensions des pores du gel. Avec les gels à 15% et 20%, dont les pores sont très fins, l'importance de cette zone est augmentée.

Nous pouvons conclure que la variation de concentration des gels, pour un système tampon donné, fait considérablement varier l'aspect de nos électrophorégrammes.

Il est illusoire de vouloir obtenir une séparation optimale avec une seule concentration de gel. Nous pensons que le gel à 7 % est celui qui donne le plus d'informations, le gel à 11 % permettant de préciser les fractions les plus rapides.

Système tampon II et gels à diverses concentrations en acrylamide

Dans le système tampon I, les protéines migrent à un pH de 9,5; nous avons voulu essayer un système créant un pH plus faible, c'est le système tampon II où les protéines migrent à pH 8.

Les conditions expérimentales sont les mêmes que précédemment. L'électrophorèse a duré 39 minutes. Dans la figure 19, nous comparons à 7% et 11% des électrophorégrammes obtenus avec les deux systèmes tampons.

Si les bandes rapides sont assez bien définies avec ce système tampon, il n'en est pas de même dans les zones intermédiaires et lentes; ce qui nous le fait rejeter.

2°) Influence de la quantité d'échantillon déposée

Des quantités différentes de protéine déposées sur une colonne de gel donnent des aspects électrophorétiques différents.

Nos mélanges protéiques étant très complexes, certaines protéines s'y trouvent à des concentrations importantes alors que d'autres ne s'y trouvent que sous forme de traces.

Il faut donc, pour chaque mélange protéique, définir la quantité optimale de protéine à déposer pour qu'il apparaisse le plus possible de bandes et que cependant une trop forte concentration n'amène pas de bandes dont la trop grande importance relative risque de masquer des bandes plus fines.

La figure 20 représente deux électrophorèses réalisées avec 5 µl

[c]	7%		11%	
ϕ Å	52	52	40	40
Tampon	I	II	I	II
Zone Lente	6	5	4	5
Zone intermédiaire	5		4	
Zone rapide	9	9	10	9
Total de bandes	20	14	18	14

Figure 19.- Electrophorégrammes obtenus dans des systèmes-tampons différents pour des concentrations de 7% et 11% en acrylamide.
Extrait de la partie transparente du muscle adducteur de C.angulata.

et 31 µl de la même solution protéique. 5 µl est une quantité trop faible qui ne permet pas de voir certaines bandes qui apparaissent avec 31 µl.

Il faut, en outre, pour que des électrophorégrammes soient absolument comparables, que les volumes déposés sur chaque colonne soient identiques.

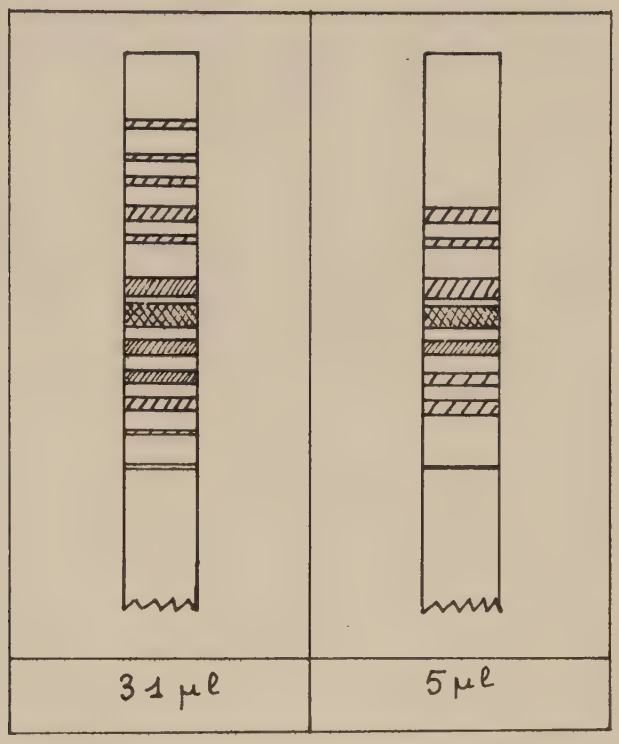


Figure 20.- Electrophorégrammes réalisés avec des quantités différentes de protéines.

3°) Influence de la coloration, décoloration, augmentation de volume des gels

a - Coloration

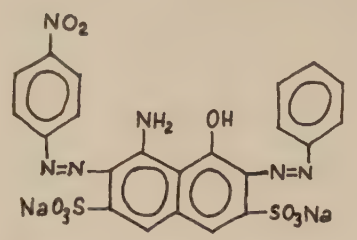
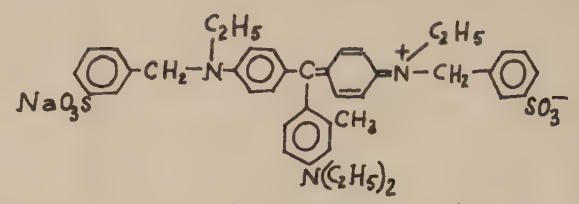
Nous avons employé deux colorants différents : le noir amide et le coomassie suivant les modes opératoires figurant au tableau XX.

Coloration au noir amide

Le noir amide (Amidoschwarz 10 B, Naphtol blue black, Aniline blue

TABLEAU XX

Coloration des électrophorégrammes

	Noir amide (C.I. 20.470)	Coomassie (C.I. 42.660)
Formules		
Fixation et Coloration	- Fixateur et colorant Noir amide 0,5 g Sol. A. acétique à 7% q.s.p. 100 ml - Méthode Fixation - coloration pendant 1 heure sur disque tournant	- Fixateur Acide sulfosalicylique 20 g Eau distillée q.s.p. 100 ml - Colorant Coomassie 0,25 g Eau distillée q.s.p. 100 ml - Méthode Fixation : 18 heures Coloration : 3 heures sur disque tournant
Décoloration	- Sol. acide acétique à 7 % Bains successifs pendant 48 heures ou mieux : Décoloration électrophorétique transversale : 20 minutes à 1 ampère	- Sol. acide acétique à 7 % 5 bains de 30 minutes.
Conservation	Solution d'acide acétique à 7 %	
Evaluation semi-quantitative	Densitomètre avec filtre de bande rouge centré sur 620 mμ	Densitomètre avec filtre de bande vert centré sur 541 mμ

black etc ...) porte au Color Index le n° 20470. Appliqué pour la première fois à la révélation des protéinogrammes par GRASSMAN, HANNIG et KNEDEL, en 1951 (71), ce colorant, très connu et universellement employé, est d'une bonne sensibilité.

Il nous a donné toute satisfaction. Nous avons cependant remarqué des différences de teinte et d'intensité de coloration, allant du bleu franc au bleu violet, avec des colorants d'origines commerciales différentes. Aussi avons-nous dû travailler avec des colorants de même origine. Son maximum d'absorption est à 620 mμ.

Coloration au coomassie

Le coomassie (coomassie brillant blue R 250 (ICI), acid blue 83) porte au Color Index le n° 42660. C'est un dérivé du triphénylméthane. En milieu légèrement acide, l'anion coloré est attiré par les groupes NH_3^+ des protéines. Le complexe formé est relativement solide. Ce colorant a été appliqué pour la première fois à la révélation des protéinogrammes sur acétate de cellulose par FAZEKAS de St. GROTH, WEBSTER et DATYNER en 1963 (52). Ces auteurs font remarquer que les métaux lourds altèrent les propriétés colorantes du produit et gênent la décoloration qui doit suivre. La coloration au coomassie est dix fois plus sensible que la coloration au noir amide. Nous avons employé la méthode de coloration de MAIZEL (141) qui donne une coloration violet pâle (appréciation subjective), dont le maximum d'absorption est à 549 mμ.

Sensibilité des deux colorants

Nous nous sommes rendus compte de la plus ou moins grande sensibilité de la méthode de coloration.

Dans la figure 21, nous montrons deux électrophorégrammes identiques, l'un révélé au noir amide et l'autre au coomassie. Le coomassie révèle mieux que le noir amide les bandes les plus rapides. Par contre, le noir amide est intéressant pour la zone lente, car le fond, se décolorant mieux qu'avec le coomassie, les fines bandes apparaissent plus nettement.

L'affinité d'un colorant varie avec le type de protéine. Nos mélanges protéiques étant très complexes, nous n'avons pas approfondi ce problème.

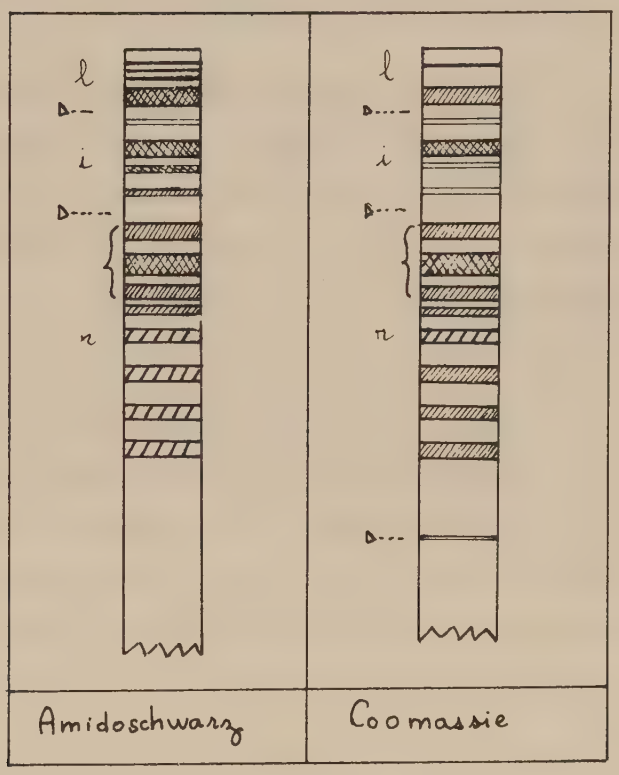


Figure 21.- Sensibilité de deux colorations.

b - Décoloration

La décoloration est une opération lente dont nous avons cherché à réduire la durée.

Décoloration par diffusion

Le noir amide demande plusieurs bains successifs d'une solution d'acide acétique à 7 % pendant 48 heures.

Pour le coomassie, la décoloration du fond est assez bonne avec 5 bains de 30 minutes. Nous avons toujours conservé cette méthode pour le coomassie. Par contre, pour le noir amide, nous avons adopté une méthode de décoloration dynamique.

Décoloration par électrophorèse

Elle peut être longitudinale ou transversale.

Pour la décoloration longitudinale (figure 15), les deux bacs de la cellule d'électrophorèse sont remplis d'une solution d'acide acétique à 7 %. Les colonnes de gel, une fois colorées, sont transférées dans des tubes d'un diamètre légèrement supérieur à celui de ces colonnes et obturés à leur extrémité inférieure par un bouchon de gel de polyacrylamide très poreux. Ces tubes sont introduits dans les joints d'étanchéité du bac supérieur. On pratique l'électrophorèse à 12,5 mA par colonne, ce qui provoque la migration du colorant non fixé sur les protéines. La décoloration ne dure qu'une heure, mais la méthode est critiquable pour diverses raisons. Nous avons constaté que le gel d'obturation des tubes, très fragile, peut se briser. La solution du bac supérieur se vide dans le bac inférieur; il en résulte des ennuis graves pour le matériel allant jusqu'à la fusion de l'électrode de platine supérieure (F° = 1774°C).

La décoloration électrophorétique transversale (figure 15) n'offre pas ces inconvénients. Elle est encore plus rapide et plus rationnelle, car les ions colorés n'ont qu'un faible parcours à effectuer pour quitter le gel. Nous l'avons retenue et pratiquée dans un appareil(*) constitué par une cuve rectangulaire à double paroi refroidie par l'eau du robinet et munie de deux électrodes en graphite. Une cloison double, renfermant les colonnes de gel et formée de 2 plaques de polyéthylène poreux, sépare les compartiments cathodiques et anodiques. On crée un champ électrique entre les deux électrodes de charbon. L'intensité électrique peut atteindre 1 ampère. La décoloration est terminée en 20 minutes.

c - Augmentation de volume des gels

A la coloration, à la décoloration et au stockage, se produit une augmentation de volume des gels qui devient importante pour les fortes concentrations en acrylamide.

(*) Shandon, 65 Pound lane, Willesden, London NW 10

Ce gonflement est probablement dû à des impuretés du monomère ou du comonomère (146). Il rend difficile la comparaison qualitative d'électrophorégrammes obtenus avec des concentrations de gel différentes.

Certains auteurs réalisent des électrophorèses en gel de polyacrylamide avec gradient de concentration tant en colonne que sur plaque. Les plaques rectangulaires au départ, prennent après coloration et décoloration une forme trapézoïdale (230)

Le tableau XXI rend compte du gonflement des gels pour une expérience donnée. Nous n'y faisons figurer que le phénomène le plus génant qui est l'allongement. Il se produit, en outre, une augmentation du diamètre des gels qui peut passer de 5 millimètres à 6,5 millimètres. Les gonflements sont sensiblement équivalents, que l'on décolore par diffusion ou par électrophorèse transversale.

Ultra micro-méthodes et méthodes préparatives

Divers auteurs ont tenté de miniaturiser la méthode en fabriquant des colonnes de gel dans des tubes capillaires. D'autres ont réussi des migrations dans une "fibre" de gel de polyacrylamide. Ces méthodes ne sont pas adaptées au caractère de notre travail. Mais, par contre, nous avons commencé à réaliser des séparations sur colonne préparative, pour des recherches ultérieures.

TABLEAU XXI

Allongement des colonnes de gel à diverses concentrations en acrylamide
(Décoloration électrophorétique transversale)

	Longueurs des gels en millimètres						
Cion des gels	Longueur initiale des gels	après 1 H de coloration au noir amide	après 20' de décoloration.	après 16 H	après 40 H	après 61 H	Variation ΔL
7 %	60	60	62	66	68	68	8
9 %		65	68	80	83	83	23
11 %		68	70	82	87	87	27
15 %		69	71	83	87	87	27
20 %		70	73	85	89	89	29

CINQUIEME PARTIE

APPLICATIONS DES TECHNIQUES A L'ETUDE DES PROTEINES DU MUSCLE ADDUCTEUR D'OSTREIDAE

Nous avons indiqué les méthodes employées par différents auteurs pour l'extraction des protéines solubles des tissus musculaires, et pour leur analyse. Par des études systématiques et comparatives de certaines de ces méthodes, nous avons pu les améliorer et mettre au point des techniques délicates certes, assez longues à mettre en oeuvre mais donnant des résultats reproductibles.

Dans la dernière partie de notre thèse, nous présenterons les résultats obtenus avec ces techniques, en les discutant. Nous nous efforcerons pour terminer d'envisager quelques applications possibles de ces résultats.

I - DETERMINATION DE LA TENEUR EN PROTEINES

Nous avons utilisé les muscles adducteurs de trois espèces d'huîtres

Crassostrea angulata
Crassostrea gigas
Ostrea edulis

dont les provenances ont été indiquées. Nous avons préparé, selon la technique exposée dans la troisième partie de ce travail, des extraits aqueux avec un tampon phosphate de force ionique 0,05 et de pH 7,5.

Certains extraits proviennent du muscle complet (M.C.), d'autres de la partie transparente (P.T.) ou de la partie nacrée (P.N.).

La teneur globale en protéines de nos extraits a été estimée par spectrophotométrie différentielle à 215 - 225 mμ suivant les modalités déjà exposées.

Le tableau XXII exprime les résultats en milligrammes par millilitre. Les quantités de protéines ainsi extraites sont faibles pour une même espèce. En ce qui concerne Crassostrea angulata et Ostrea edulis, les deux espèces courantes en France, ces quantités varient parfois assez largement d'un extrait à l'autre pour un type de muscle. On peut se demander s'il n'y a pas des corrélations éventuelles entre la concentration protéique des extraits et l'époque d'extraction. Nous n'avons pas suffisamment d'expériences pour formuler une telle hypothèse.

On peut remarquer cependant que :

- les extraits protéiques des Crassostrea sont toujours plus concentrés que ceux d'Ostrea,

- les parties transparentes des muscles adducteurs fournissent généralement des extraits plus concentrés que les parties nacrées.

Le diagramme de la figure 22 montre le comportement de la partie transparente et de la partie nacrée d'O. edulis vis à vis de solutions salines (Tampon phosphate + KCl) de forces ioniques croissantes : 0,05; 0,15; 0,25; 0,35 et de pH 7,5. Les quantités de protéines extraites sont plus élevées pour la partie transparente. De plus, au-delà d'une force ionique de 0,25, les teneurs en protéines augmentent beaucoup. Nous assistons alors à l'extraction des protéines de structure quantitativement plus importantes dans le muscle adducteur que les protéines sarcoplasmiques.

Ces résultats, qui confirment ceux de BAILEY (6), peuvent s'expliquer par les données histologiques et physiologiques que nous avons déjà développées.

En effet, les filaments contractiles du muscle adducteur remplissent presque toute la fibre, ce qui explique la concentration peu élevée de nos extraits à faible force ionique.

De plus, le tissu conjonctif interfasciculaire, plus développé dans la partie nacrée, rend compte, en partie, de sa teneur moins élevée en protéine. Mais, il ne faut pas négliger les profondes différences physiologiques existant entre les deux parties du muscle adducteur. Elles peuvent avoir un effet déterminant sur les concentrations sarcoplasmiques.

La fonction plus complexe de la partie transparente de l'adducteur de Crassostrea par rapport à Ostrea peut expliquer sa plus grande teneur en protéine soluble. La différence quantitative entre les extraits des parties nacrées des deux genres est plus délicate à élucider; il faut noter qu'elle est moins importante.

T A B L E A U - XXII

Concentration en mg/ml des extraits protéiques obtenus à l'aide du tampon phosphate de force ionique 0,05 et de pH 7,5.

	Crassostrea angulata			Crassostrea gigas			Ostrea edulis		
	M.C	P.T	P.N	M.C	P.T	P.N	M.C	P.T	P.N
Mars				3,98 4,10	4,85	3,00			
Avril		5,4	3,8						
Mai								4,05	2,50
Juillet	4,72 4,12 4,25	4,58	2,46				3,91 3,84 3,25	3,40	1,53
Novembre	4,57								
Décembre								3,92	3,96

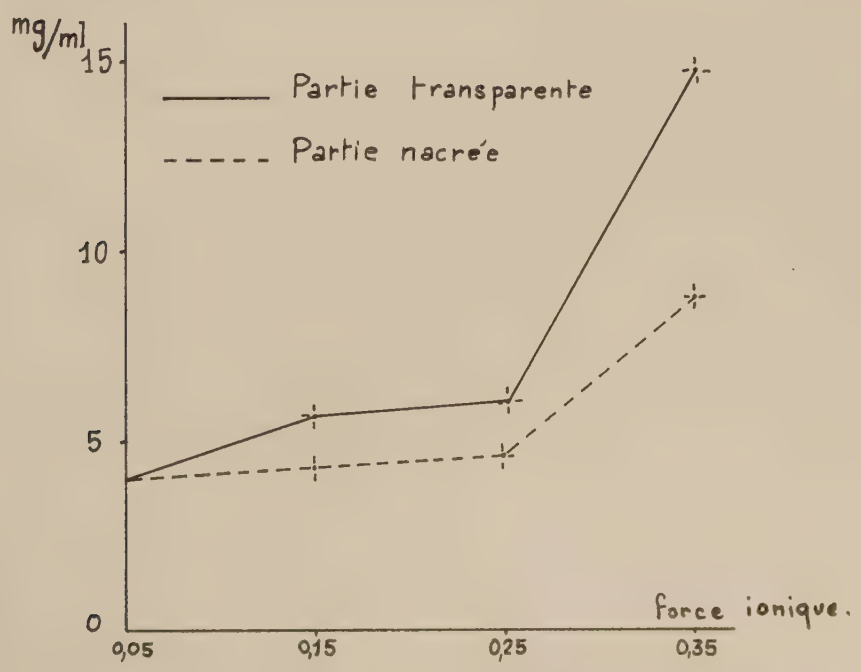


Figure 22.- Extraction des parties transparentes et nacrées de l'adducteur d'O. edulis à différentes forces ioniques.

II - APPLICATIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION

A notre connaissance, les protéines solubles des muscles ont été peu étudiées par chromatographie d'exclusion-diffusion et rares sont les auteurs qui les ont considérées dans leur ensemble. L'Ecole Belge (58) fractionne sur colonne de Sephadex G-75, les myogènes d'Invertébrés et surtout de Vertébrés inférieurs, voulant mettre en évidence des protéines de faibles poids moléculaires. SERBAN (228), en Roumanie, teste l'homogénéité d'une fraction protéique sarcoplasmique du gastrocnémien de la grenouille Rana ridibunda sur colonne de Sephadex G-100. MORELAND et WATTS (158) étudient en 1967 le poids moléculaire des isoenzymes de l'arginine kinase chez les mollusques bivalves. Ils fractionnent les extraits sarcoplasmiques sur colonne de Sephadex G-100 et localisent dans l'éluat la position de l'enzyme. RAMPONI, TREVES et GUERRITORE (196) estiment le poids moléculaire de l'acylphosphatase isolée du muscle de cheval sur colonne de Sephadex G-75 et son point isoélectrique par chromatographie d'exclusion-diffusion sur plaque suivie d'une électrophorèse dans une direction perpendiculaire.

En passant nos extraits sur Sephadex, tant sur plaques que sur colonnes, nous avons obtenu des diagrammes chromatographiques que nous avons étudiés et comparés. Les protéines sarcoplasmiques sont des protéines globulaires et rien ne permet de penser que certaines soient glycoprotéiques, aussi leur densité partielle est-elle la même. Elles se répartiront donc selon leurs poids moléculaires le long du diagramme chromatographique. Nous pouvons estimer les poids moléculaires aux "pics" de ces diagrammes. Il est illusoire de vouloir obtenir des séparations complètes sur des mélanges aussi hétérogènes.

A - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Les séparations sont effectuées sur Sephadex G-100 "Superfine" et G-200 "Superfine". Sauf spécification, les extraits sont obtenus avec un tampon phosphate de force ionique 0,05 et de pH 7,5 qui sert aussi d'éluant.

Lorsque nous "chromatographions" les extraits, nous obtenons, après révélation, une série de taches très bien définies, reliées entre elles par un fond continu coloré. La densitométrie donne une série de pics bien marqués, mais se chevauchant l'un l'autre.

A l'étude qualitative, nous joignons des critères semi-quantitatifs tels que le R_b définissant la place des taches et le pourcentage des surfaces des pics qui donne un aperçu de la valeur relative des fractions.

Nous présenterons quelques résultats chromatographiques et électrophorétiques, étudiés d'une manière statistique. Nous utiliserons la distribution de "t" de STUDENT, applicable aux petits échantillons (*).

Nous indiquons dans nos tableaux les éléments suivants :

n	=	nombre de mesures
$\bar{x}$	=	moyennes
s_m	=	erreur - type de la moyenne
$x \pm ts_m$	=	limites de confiance de la moyenne (nous avons généralement adopté un coefficient de confiance de 95 %)
$\frac{ts_m \times 100}{x}$	=	imprécision en pour cent

- Résultats

Pour chaque espèce d'huître, nous avons étudié les extraits pro-

(*) Les calculs ont été réalisés sur le calculateur électronique OLIVETTI "Programma 101".

téiques du muscle adducteur complet et de ses deux parties : transparente et nacrée.

a) Crassostrea angulata

En chromatographie sur G-100 (figure 23a),

Nous avons obtenu 3 fractions bien définies pour l'extrait du muscle complet et de la partie transparente (fraction 1,exclue; fraction 2; fraction 3). Par contre, l'extrait de la partie nacrée se caractérise par une fraction 3 très peu marquée et l'absence de la fraction 2 intermédiaire.

Le tableau XXIII indique les moyennes et les éléments statistiques des R_b des différentes fractions. Nous remarquons, compte tenu d'une certaine imprécision de nos mesures, que les R_b des fractions homologues sont sensiblement les mêmes.

Les tracés densitométriques (figures 24a,b,c) explicitent l'intensité des taches colorées au vert de lissamine. Le tableau XXIV exprime en pourcentage les valeurs des pics obtenus.

La figure 25 est une superposition des diagrammes densitométriques d'un extrait de partie transparente et d'un extrait de partie nacrée. Les pics 1 et 3 se retrouvent au même niveau. Le pic 2 de la partie transparente n'a pas son homologue dans la partie nacrée.

En chromatographie sur G-200 (figure 23b),

Pour les extraits de muscle complet et de partie transparente, outre les fractions 1, 2 et 3, apparaît une zone de fractionnement assez mal définie que nous appelons 1', car elle provient de la division de la fraction 1. Les fractions 2 et 3 sont moins bien séparées que sur G-100. Tout ceci est confirmé par la comparaison des tracés densitométriques d'un extrait de muscle complet sur G-100 (figure 24a) et sur G-200 (figure 26a).

Le G-200 étant un Sephadex moins réticulé que le G-100 permet un fractionnement plus poussé des molécules de poids moléculaires élevés.

Pour la partie nacrée, on note, comme sur G-100, l'absence de la tache 2 et une tache 3 très faible.

b) Crassostrea gigas

Les aspects chromatographiques (figures 23c,d) sont les mêmes pour C. gigas que pour C. angulata et les tracés densitométriques comportent le même nombre de pics que C. angulata, aussi bien sur G-100 (figure 24d,e,f) que sur G-200 (figure 26b). La figure 25b représente les densitométries des parties transparentes et nacrées.

Les tableaux XXIII et XXIV rendent compte des divers paramètres mesurés.

c) Ostrea edulis

Les aspects chromatographiques sont ici bien différents.

En chromatographie sur G-100

Sur les chromatogrammes, on a 2 fractions bien définies 1 et 3, séparées par une zone z pour les extraits de muscle complet et de partie transparente. Pour la partie nacrée, seule la fraction 1 persiste nettement, la fraction 3 subsistant sous forme de trace (figure 23e). Le tableau XXIII indique les moyennes des R_b des différentes fractions. Les fractions homologues ont le même R_b.

Les figures (24g,h) confirment par densitométrie les aspects chromatographiques. Le tableau XXIV exprime en pourcentages les valeurs des fractions.

En chromatographie sur G-200

Pour le muscle complet et la partie transparente (figure 23f), on observe deux fractions 1 et 3 séparées par une fraction 1'. La comparaison des densitométries des résultats obtenus sur G-100 et sur G-200 confirme que la fraction 1' provient du dédoublement de la fraction 1 (figures 24g et 26c).

La partie nacrée est presque exclusivement représentée par la fraction 1, la fraction 2 est absente et la fraction 3 est peu marquée comme pour les Crassostrea.

- Comparaison

1° Sur G-100, le muscle complet et la partie transparente donnent 3 pics chez C. angulata et C. gigas, mais l'on obtient pour O. edulis un diagramme simplifié, avec seulement 2 pics. La figure 27 met ce fait en évidence pour les parties transparentes. La comparaison des R_b fait apparaître que les fractions 1 et 3 migrent de la même façon pour les trois espèces et au pic 2 des Crassostrea correspond la zone z d'Ostrea (Tableau XXIII). Les pics 1 et 3 des Crassostrea sont importants par rapport au pic 2.

2° Pour la partie nacrée, dans les trois espèces, le pic 1, représentant les molécules exclues, est prépondérant.

3° La comparaison des densitométries pour une même espèce d'huître montre que dans le muscle complet, ce sont les protéines de la partie transparente qui imposent leur diagramme.

Tous les tracés peuvent se grouper et se classer dans le sens d'une simplification progressive :

- Muscles complets et parties transparentes des Crassostrea.
- Muscles complets et parties transparentes d'Ostrea.
- Parties nacrées.

4° Sur G-200 (figure 26), pour le muscle complet, la fraction 2 est absente chez O. edulis, mais on peut retenir une homologie des fractions 1, 1' et 3 chez les trois huîtres.

- Cas particuliers

a) Myogène et Globuline X

Les protéines solubles, myogène et globuline X du muscle complet de C. angulata et d'O. edulis, extraits selon la technique indiquée page 69 ont été fractionnés sur une même plaque de G-100 ou de G-200.

D'après les migrations obtenues sur G-100 (figure 28), aussi bien pour Crassostrea comme pour Ostrea, le myogène est caractérisé par une diminution d'intensité de la tache 1, exclue, alors que la globuline X est surtout représentée par une fraction exclue. En comparant les densitométries (figure 29) pour Crassostrea, on peut dire que les protéines solubles et le myogène ont le même aspect qualitatif; mais du point de vue quantitatif, si le pic 3 conserve son importance, les pics 2 et 1 diminuent très nettement dans le myogène. La globuline X représentée par le pic 1 semble migrer un peu moins rapidement que les pics 1 du myogène et des protéines solubles.

Pour les migrations sur G-200 (figure 30) et d'après les enregistrements densitométriques (figure 31) correspondants pour Crassostrea, la fraction 1 (exclue), présente dans les protéines solubles, disparaît dans le myogène et les fractions 1' et 2 diminuent d'importance. Mais, la fraction 1 se retrouve dans la globuline X ainsi qu'une partie des fractions 1' et 2. La globuline X semble, en outre, contenir une partie de la fraction 3, ce qui n'apparaît pas sur G-100.

b) Vieillissement d'une solution protéique

Pour préciser l'importance du vieillissement d'une solution protéique, nous avons solubilisé un extrait lyophilisé de muscle complet de C. angulata et l'avons conservé au réfrigérateur à + 4°C. Cette solution

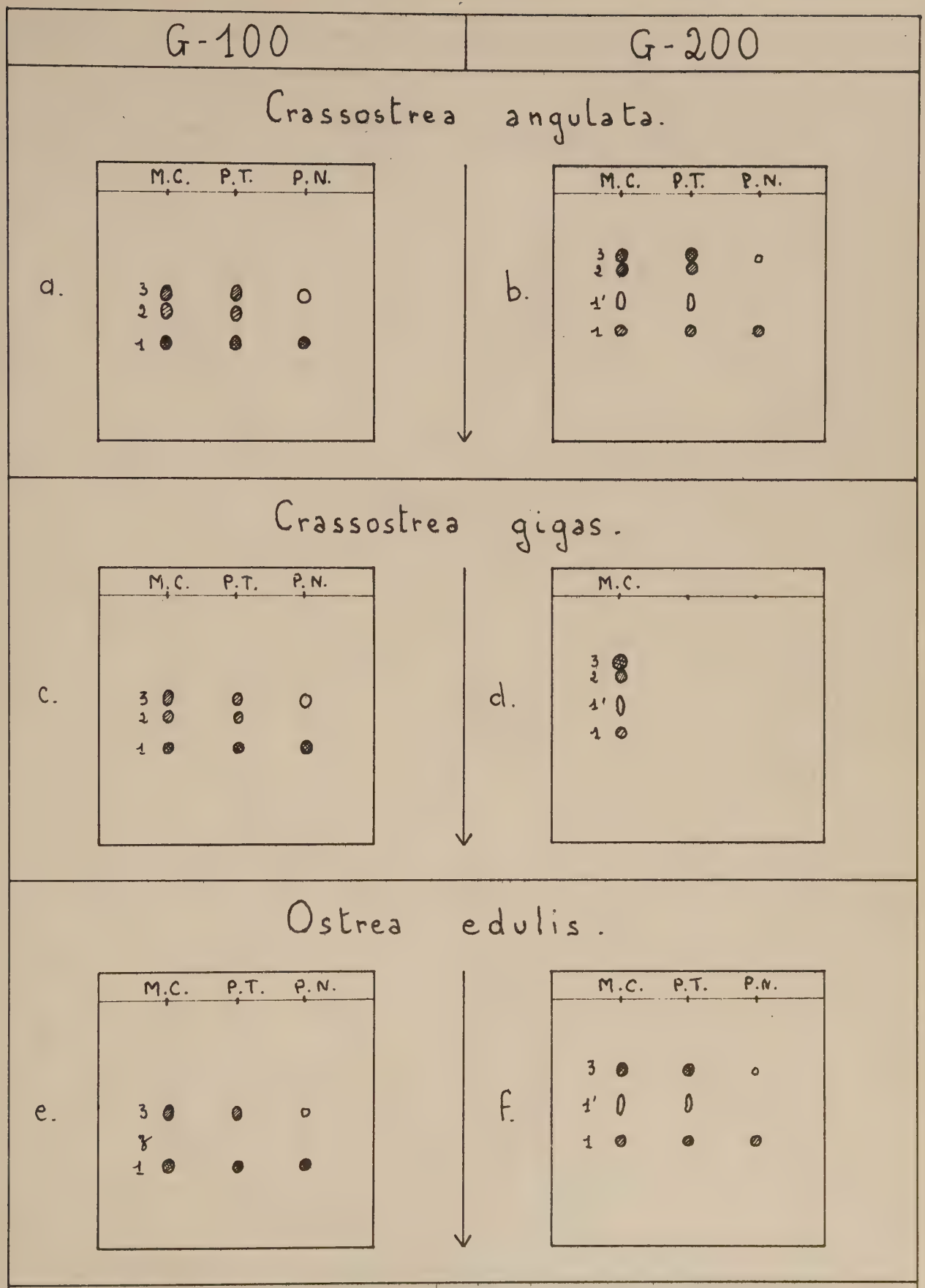


Figure 23.- Chromatogrammes des divers extraits sur couche mince de gel de Sephadex G-100 et G-200 "superfine".

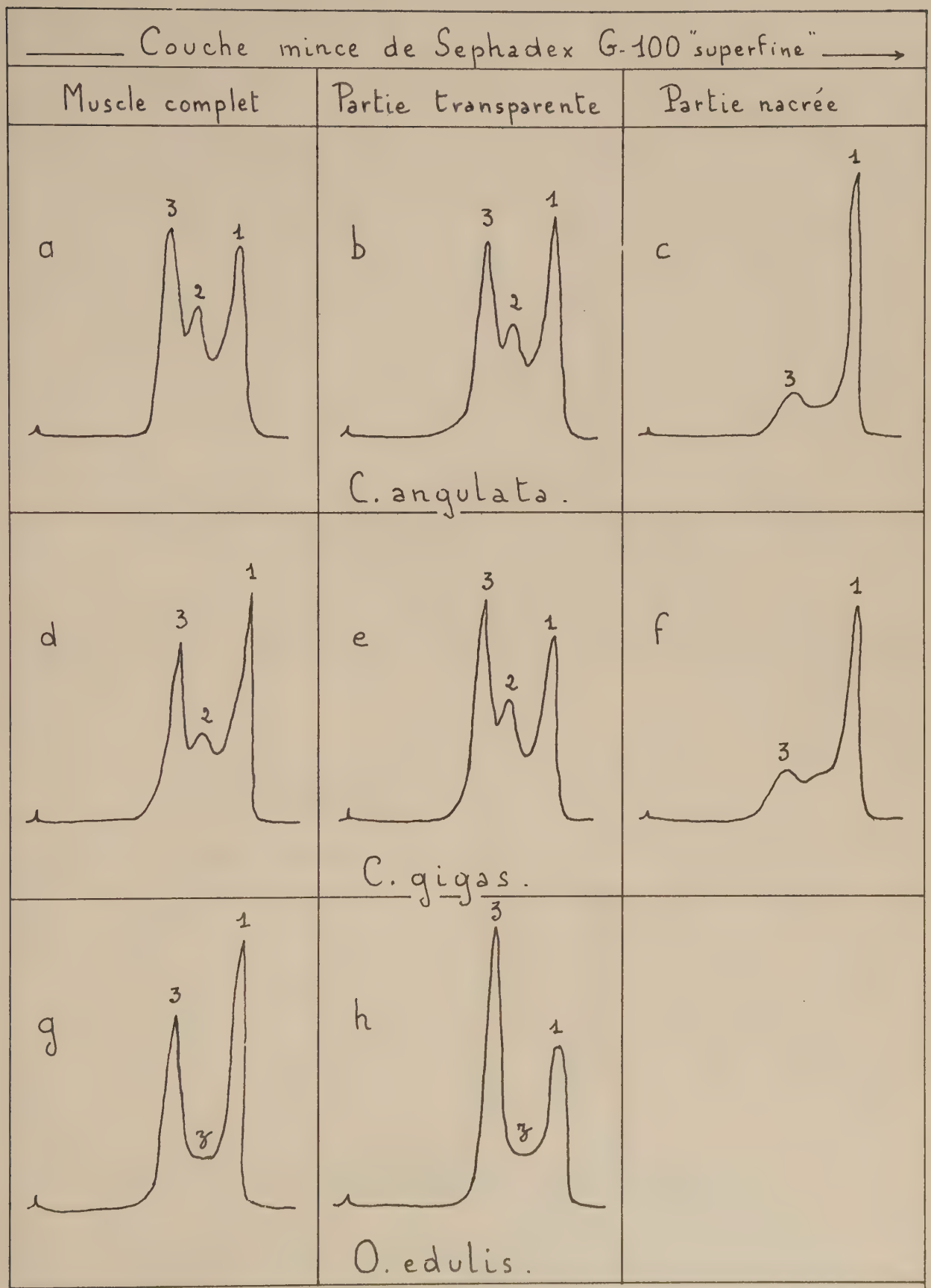
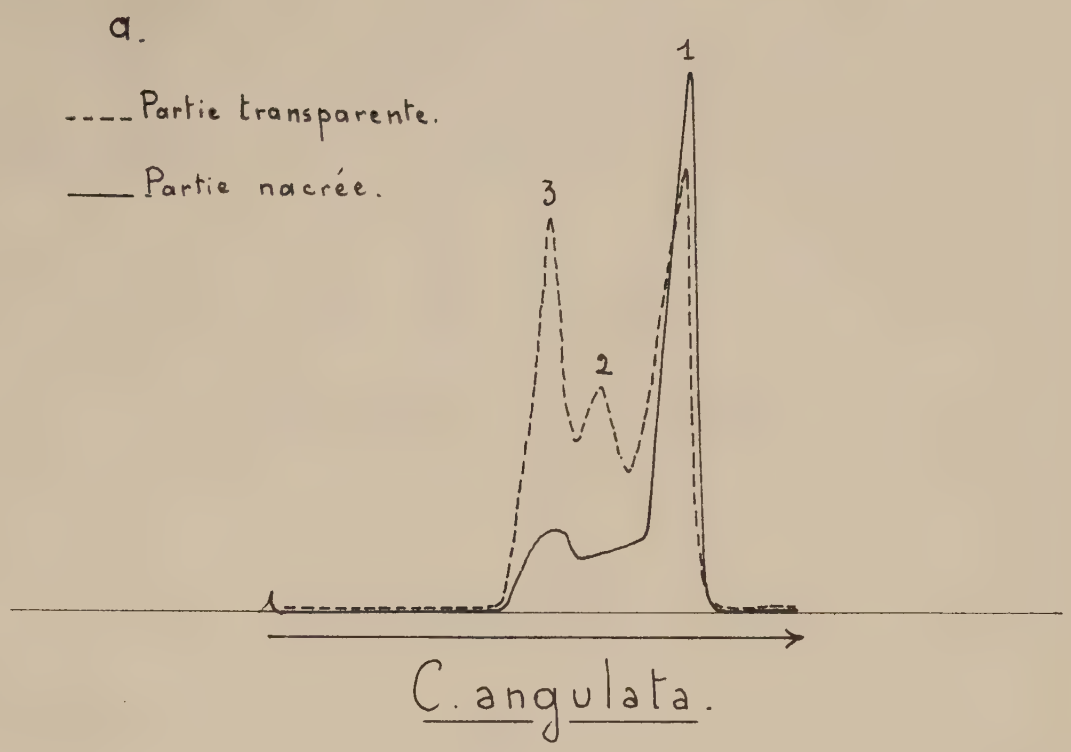


Figure 24.- Enregistrements densitométriques des chromatogrammes sur couche mince.



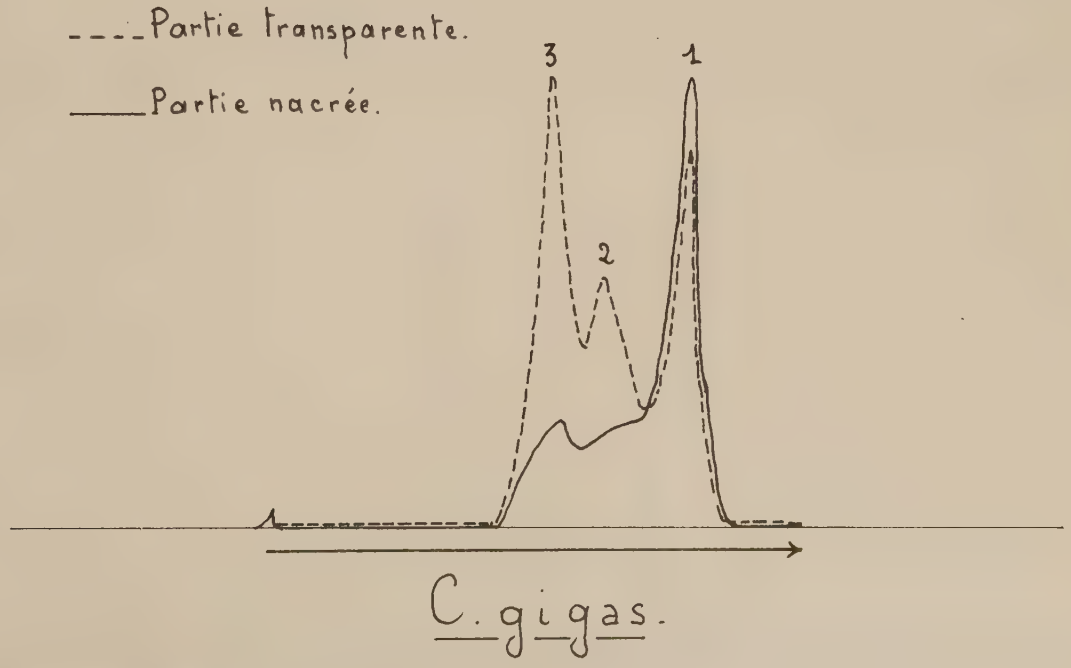


Figure 25.- Enregistrements densitométriques de chromatogrammes sur couche mince de gel de Sephadex G-100 "superfine"

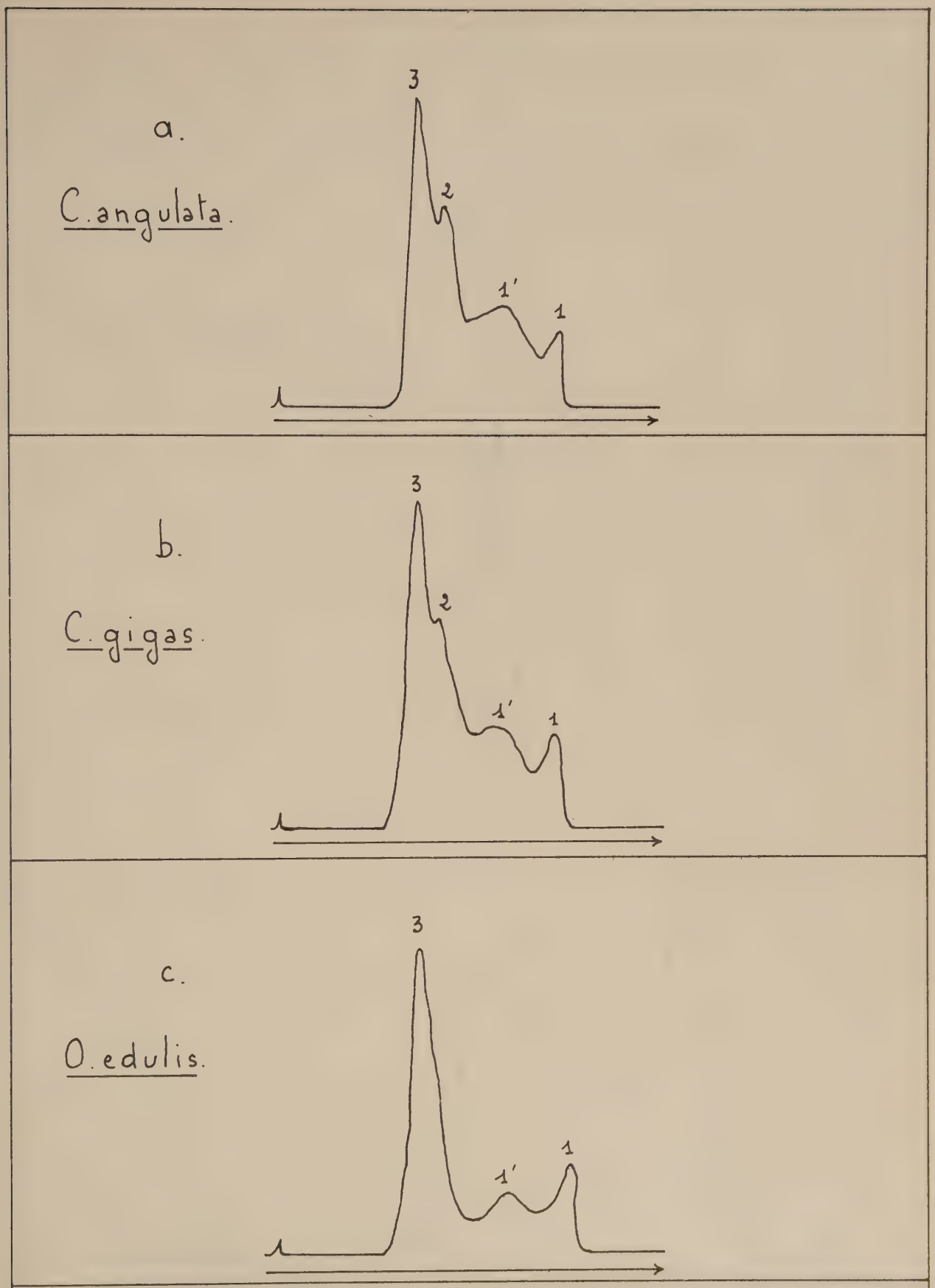


Figure 26.- Enregistrements densitométriques des chromatogrammes sur couche mince de gel de Sephadex G-200 "superfine". Extraits de muscles complets.

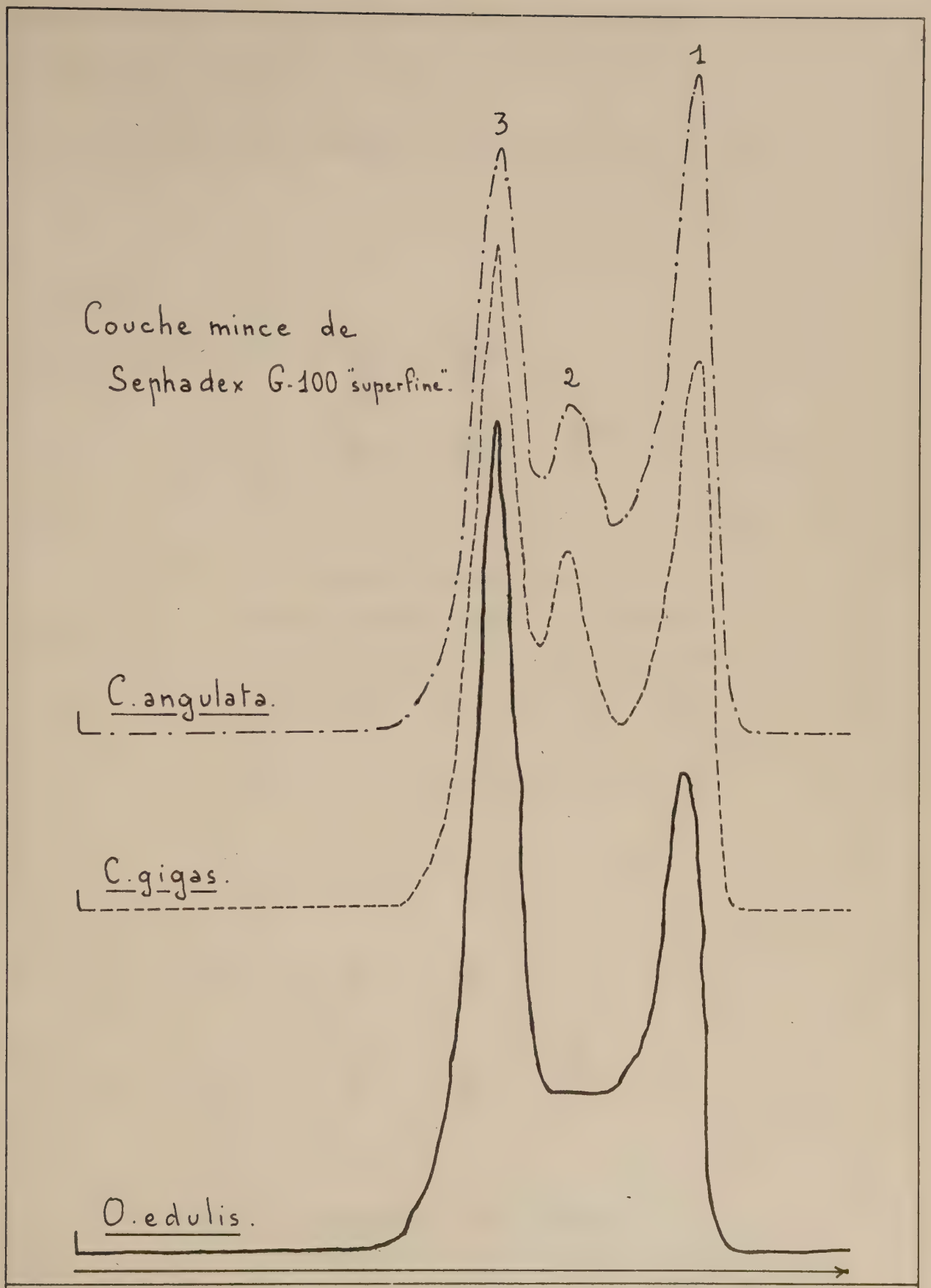


Figure 27.- Comparaison des densitométries des chromatogrammes d'extraits de parties transparentes du muscle adducteur des trois espèces d'huîtres étudiées

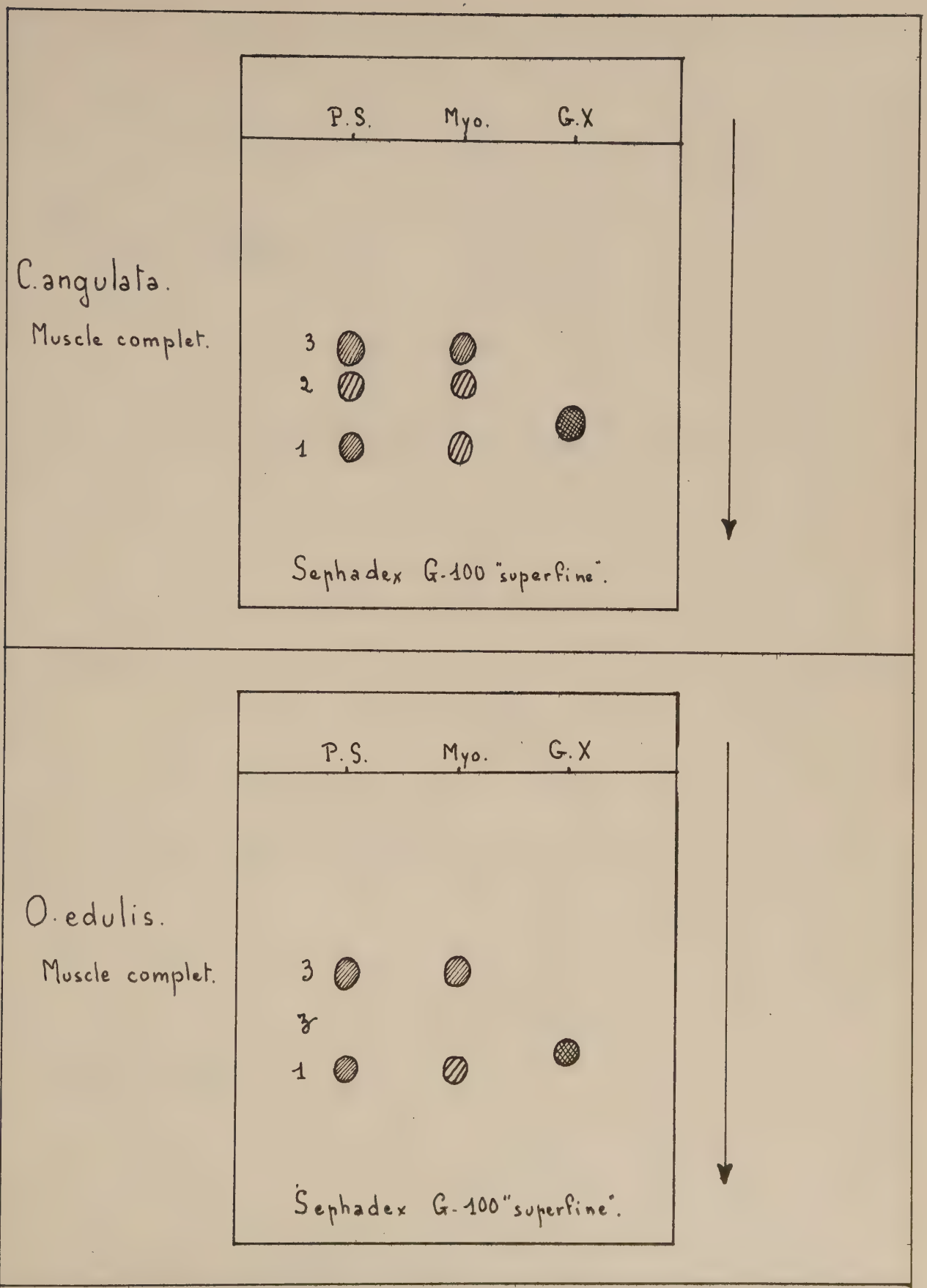


Figure 28.- Chromatogrammes sur couche mince des protéines solubles (P.S.), myogène (Myo) et globuline X (G.X.).

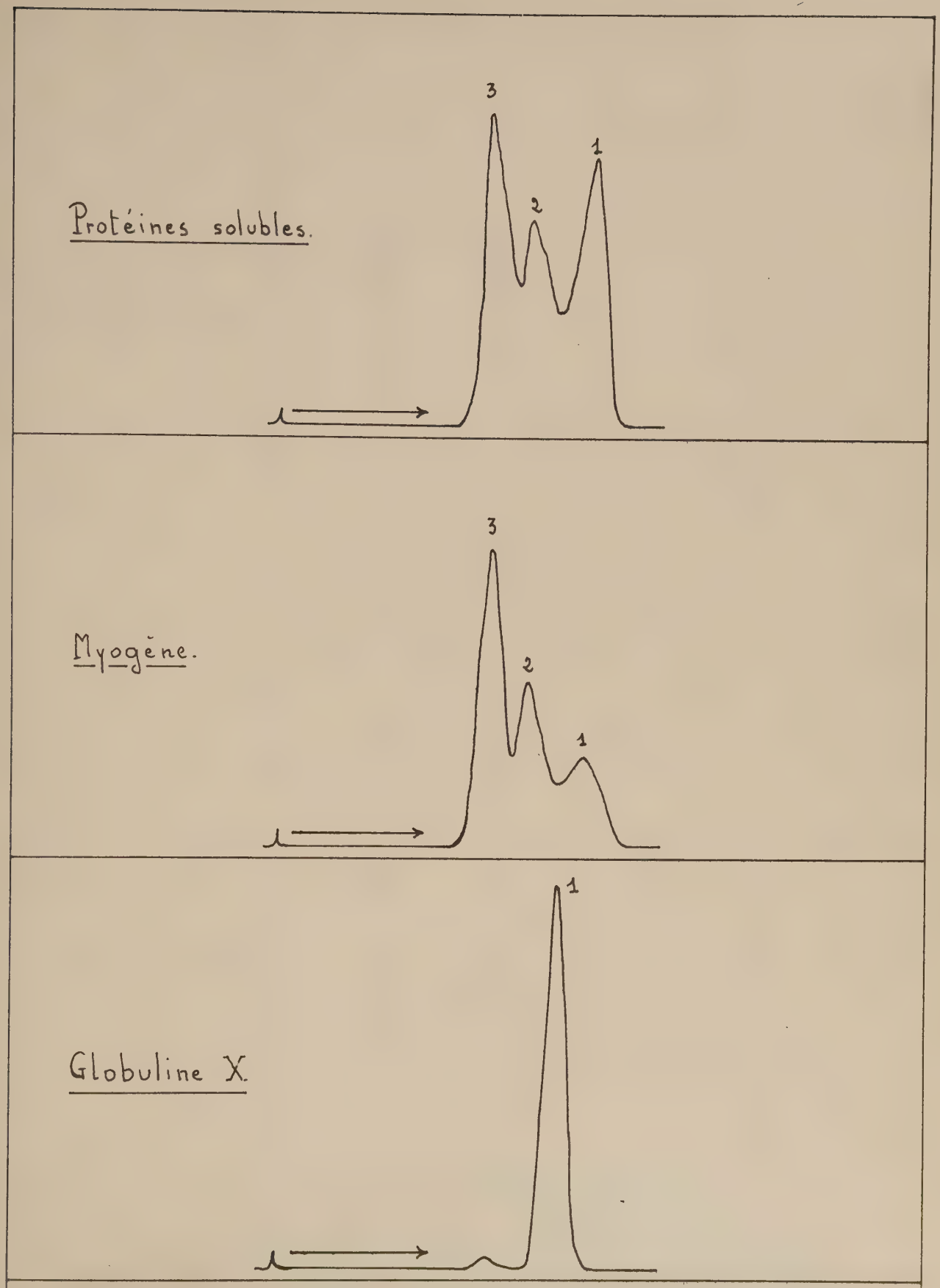
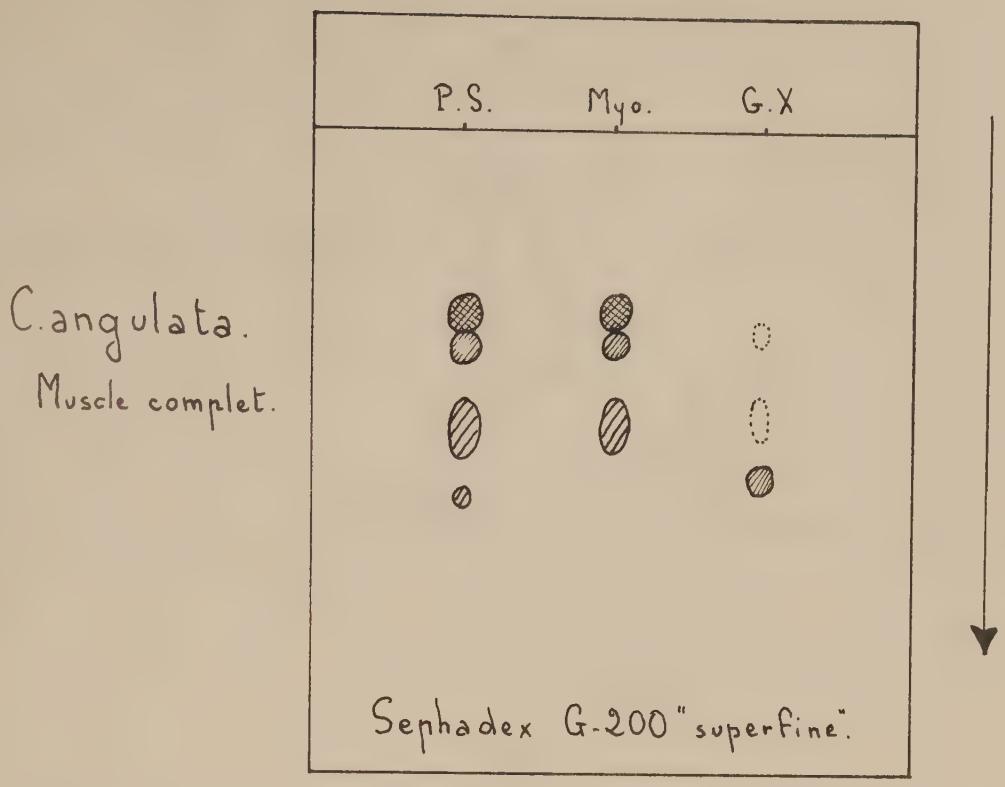


Figure 29.- Enregistrements densitométriques du chromatogramme (C.angulata) de la figure 28.



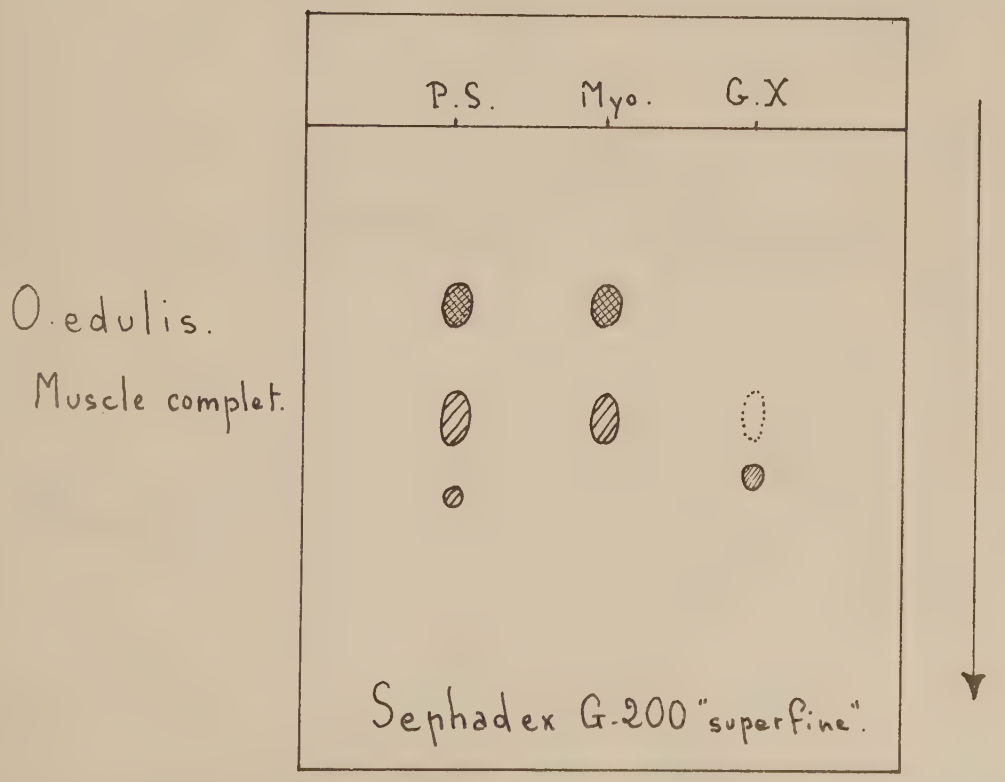


Figure 30.- Chromatogrammes sur couche mince des protéines solubles (P.S.), myogène (Myo) et globuline X (G.X.).

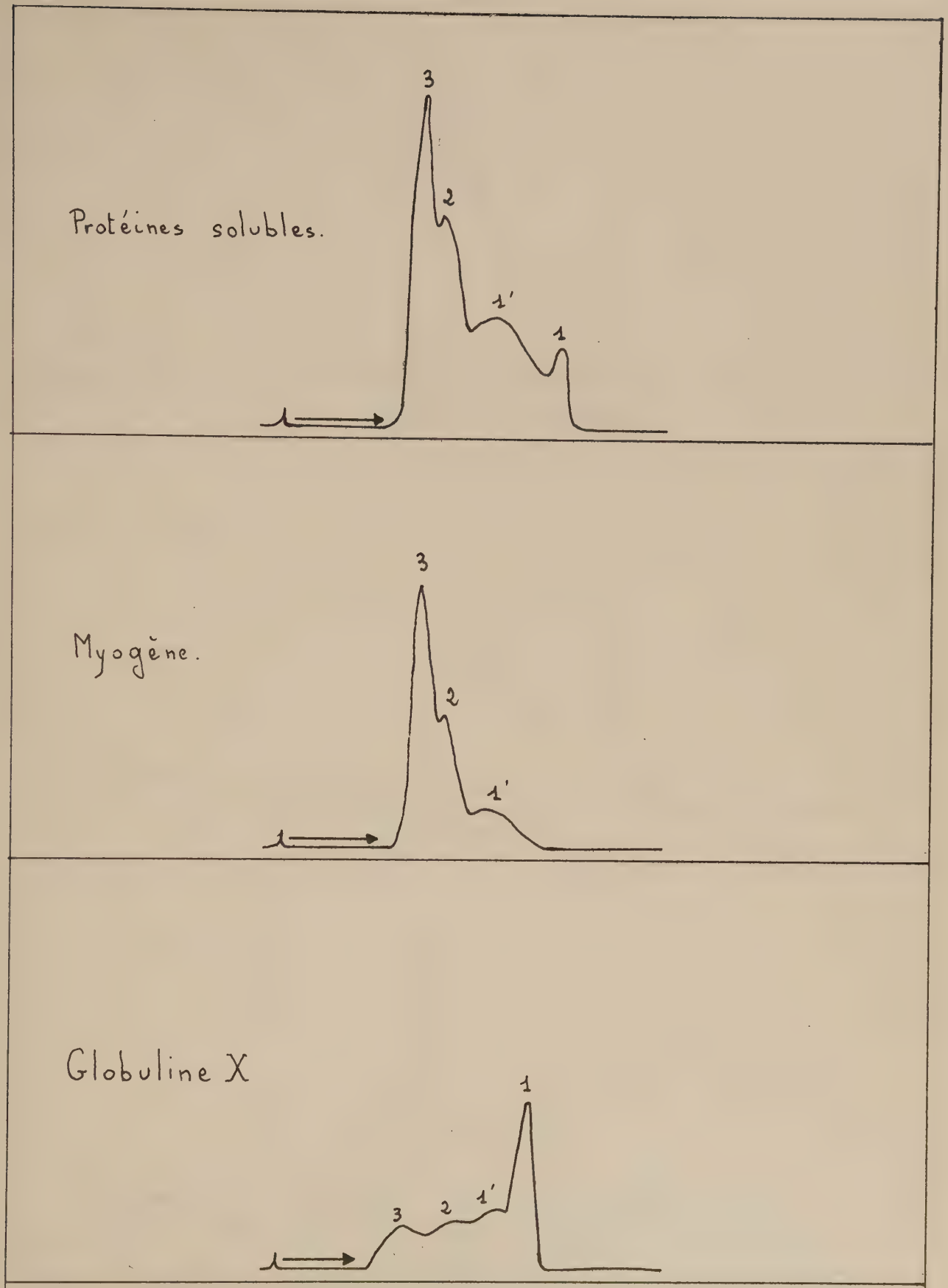


Figure 31.- Enregistrements densitométriques du chromatogramme (C.angulata) de la figure 30.

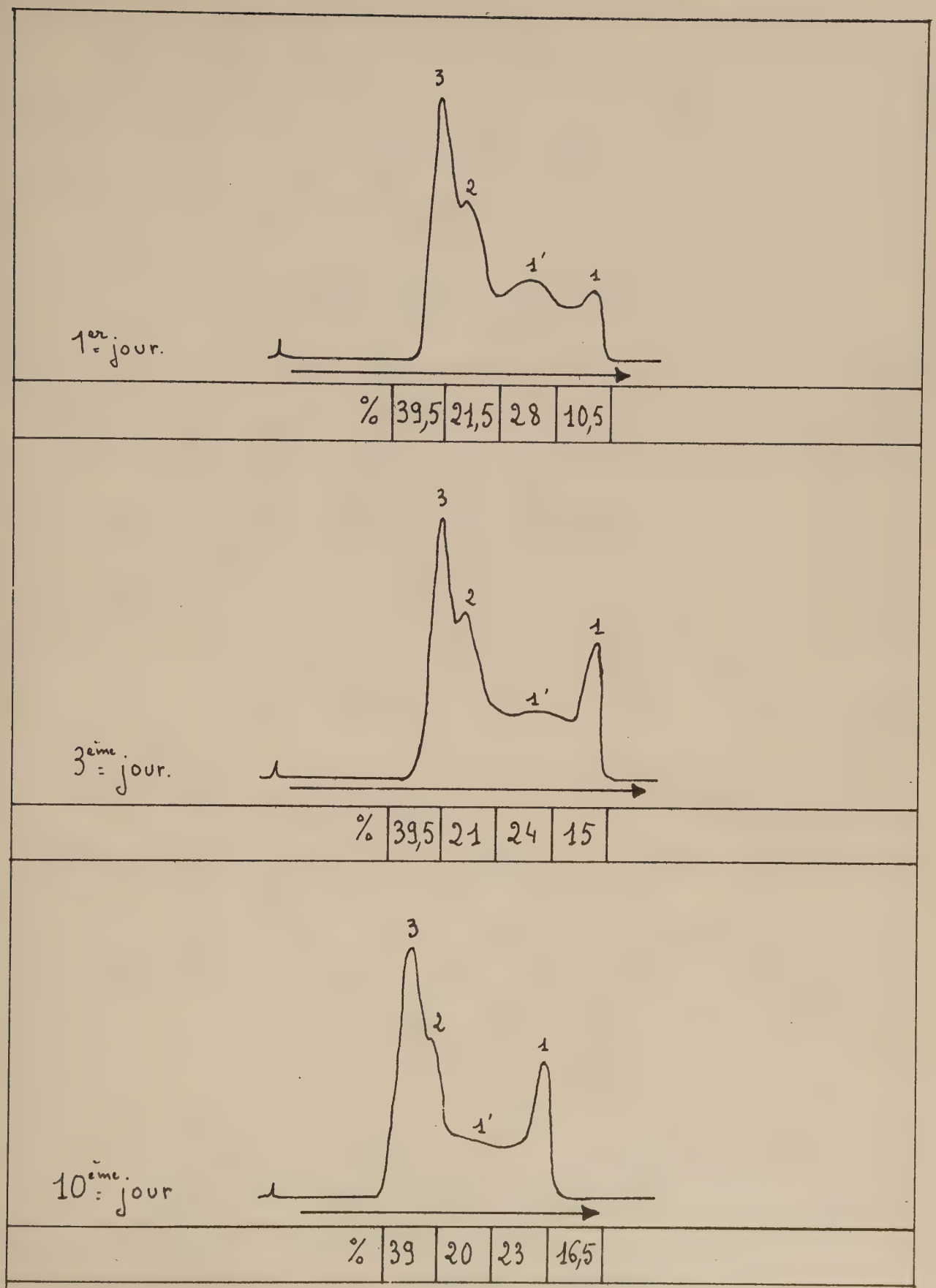


Figure 32.- Vieillissement d'un extrait protéique du muscle complet de C. angulata.

TABLEAU XXIII

Etude statistique de R_b

CRASSOSTREA ANGULATA

	M. C. n = 7			P. T. n = 7			P. N.		
Fractions	3	2	1	3	2	1	3	z	1
$\bar{x}$	0,672	0,804	(0,999)	0,663	0,790	0,981	0,693		0,991
s_m	0,003	0,004	0,001	0,002	0,003	0,004			
$\bar{x} - ts_m$ $\bar{x} + ts_m$	0,666 0,679	0,795 0,813	0,996 1,000	0,659 0,667	0,782 0,798	0,971 0,991			
$\frac{ts_m}{\bar{x}}$ x100	0,96%	1,1 %	0,24%	0,60%	1,01%	1,02%			

CRASSOSTREA GIGAS

	M.C. n = 7			P. T. n = 10			P. N.		
Fractions	3	2	1	3	2	1	3	z	1
$\bar{x}$	0,665	0,796	(0,999)	0,660	0,788	0,986	0,683		1
s_m	0,001	0,003	0,001	0,002	0,003	0,001			
$\bar{x} - ts_m$ $\bar{x} + ts_m$	0,662 0,669	0,788 0,803	0,996 1	0,655 0,665	0,782 0,794	0,983 0,989			
$\frac{ts_m}{\bar{x}}$ x100	0,52%	0,92%	0,24%	0,75%	0,76%	0,30%			

OSTREA EDULIS

	M. C. n = 10			P. T. n = 9					
Fractions	3	z	1	3	z	1			
$\bar{x}$	0,692		(0,997)	0,672		0,981			
s_m	0,004		0,002	0,001		0,001			
$\bar{x} - ts_m$ $\bar{x} + ts_m$	0,681 0,702		0,992 1	0,669 0,675		0,978 0,984			
$\frac{ts_m}{\bar{x}}$ x100	1,5 %		0,45%	0,45%		0,30%			

TABLEAU XXIV

Etude statistique du pourcentage des fractions.

CRASSOSTREA ANGULATA

	M. C. n = 7			P. T. n = 7			P. N.		
Fractions	3	2	1	3	2	1	3	z	1
$\bar{x}$	34,36	22,75	33,28	33,72	20,90	40,10	18,81	13,69	56,70
s_m	0,39	0,47	0,95	1,02	0,38	0,74			
$\bar{x} - ts_m$ $\bar{x} + ts_m$	33,41 35,31	21,60 23,89	30,94 35,62	31,25 36,19	20,00 21,80	38,29 41,91			
$\frac{ts_m}{\bar{x}}$ x100	2,76%	5,05%	7,02%	7,32%	4,30%	4,51%			

CRASSOSTREA GIGAS

	M. C. n = 7			P. T. n = 7			P. N.		
Fractions	3	2	1	3	2	1	3	z	1
$\bar{x}$	31,47	20,11	39,45	36,48	23,44	34,30	19,56	18,08	53,88
s_m	0,39	0,93	1,14	0,65	0,5	0,48			
$\bar{x} - ts_m$ $\bar{x} + ts_m$	30,52 32,41	17,84 22,38	36,67 42,24	35,01 37,95	32,31 34,57	33,22 35,38			
$\frac{ts_m}{x}$ x100	3,01%	11,3%	7,05%	4,03%	4,82%	3,15%			

OSTREA EDULIS

	M. C. n = 6			P. T. n = 9					
Fractions	3	z	1	3	z	1			
$\bar{x}$	37,34	12,49	40,69	48,76	14,40	31,62			
s_m	1,68	0,64	0,69	1,08	0,64	0,80			
$\bar{x} - ts_m$ $\bar{x} + ts_m$	33,02 41,66	10,85 14,13	38,91 42,47	46,29 51,23	12,93 15,87	29,78 33,46			
$\frac{ts_m}{\bar{x}}$ x100	11,57%	13,12%	4,37%	5,06%	10,2%	5,8 %			

protéique a été fractionnée sur G-200 à des intervalles de temps réguliers, pendant 10 jours. Sur la figure 32, sont reportés les enregistrements densitométriques du premier jour, du troisième jour et du dixième jour. Nous observons une nette augmentation du pic 1 exclu au dépend, semble-t-il, de la zone 1' qui perd de son importance. Ceci peut indiquer, soit une augmentation du volume moléculaire de certaines protéines (116), soit un phénomène d'agrégation.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Les résultats de la chromatographie sur plaque sont précisés par la chromatographie sur colonne appliquée dans un but préparatif.

Les extraits ont été fractionnés sur G-75 et G-100 "fine". Nous étudions les profils d'élution obtenus par spectrophotométrie à deux longueurs d'onde, généralement 280 mμ et 259 mμ et nous estimons l'importance relative des fractions, les Kav et les rapports 280/259 au sommet des pics. Nous établissons les spectres de diverses fractions. Nous avons noté en suivant l'élution certaines variations de conductivité et de pH.

1° - Action de différents facteurs sur les profils chromatographiques.

a) Influence de la réticulation du Sephadex

Sur G-75, comme sur G-100, nous obtenons :

- pour C. angulata (figure 33) quatre fractions : I (exclue), II et III et une fraction IV, très retardée.
- pour O. edulis (figure 34) trois fractions : I (exclue),III, séparée de I par une zone Z, et une fraction IV très retardée.

En ce qui concerne les pics, on peut remarquer :

- le pic I subit déjà un début de fractionnement sur G-75, du moins pour O. edulis qui s'accentue sur G-100 sans toutefois former deux pics bien séparés que nous appellerons Ia et Ib,

- le pic II de C. angulata est mieux individualisé sur G-100 que sur G-75,

- le pic III semble mieux défini pour Ostrea et Crassostrea sur G-100; en effet, si nous interprétons la résolution des colonnes en faisant intervenir la notion de hauteur de plateau théorique, nous remarquons (Tableau XXV) qu'avec un même extrait de C. angulata passé sur une colonne de G-75 et une colonne de G-100 sensiblement de même hauteur et à des vitesses d'élution peu différentes, nous obtenons respectivement des HEPT de 0,105 cm et 0,066 cm,

- le pic IV a le même profil sur G-75 et sur G-100, mais il se différencie en IVa et IVb pour O. edulis; en outre, le pic IV de C. angulata est plus symétrique.

b) Influence de la vitesse d'élution

Outre le choix de la réticulation du Sephadex, pour une colonne donnée, nous avons remarqué l'importance considérable de la vitesse d'élution sur le profil chromatographique, les faibles vitesses donnant les meilleurs résultats. Le tableau XXV permet de comparer les HEPT de deux colonnes de G-100 de hauteurs sensiblement égales, mais sur lesquelles les vitesses d'élution sont de 7,5 et 14,5 ml/h. Ce tableau indique en outre les limites de la notion de HEPT appliquée à notre problème.

c) Influence des méthodes de détection

Sur G-100 (figures 33b et 35a), l'ébauche des 2 pics Ia et Ib n'apparaît pas toujours nettement sur les profils obtenus par spectrophotométrie en D.O. Cependant, les profils obtenus en % de transmission (T) à l'aide de l'absorptiomètre en continu montrent toujours la présence de Ia

T A B L E A U XXV

Valeurs des HEPT pour une colonne donnée en fonction du type de Sephadex et du débit. Substance étudiée : Fraction III des protéines solubles de la partie transparente de C. angulata.

Gel	Ve et w	$N = (4\ Ve/W)^2$	H. E. P. T.
G - 75 débit : 8,9 ml/h	$Ve_{III} = 108,4$ $w = 22,1$	N = 385	$\frac{40,4}{384,94} = 0,105$ cm
G - 100 débit : 7,56 ml/h	$Ve_{III} = 128,52$ $w = 21,2$	N = 588	$\frac{39,2}{588,06} = 0,066$cm
G - 100 débit : 14,55 ml/h	$Ve_{III} = 128,7$ $w = 26$	N = 392	$\frac{40,3}{392,04} = 0,103$cm

- Le nombre de plateaux théoriques N est donné par la formule :

$$N = \left(\frac{4\ Ve}{w}\right)^2$$

dans notre cas particulier :

Ve = volume d'élution du pic III, en ml
w = base (exprimée en ml) du triangle obtenu en tracant les tangentes au pic III.

- La hauteur équivalente à un plateau théorique est donnée par la formule :

$$HEPT = \frac{H}{N}$$

où H = hauteur de la colonne de gel en cm.

- La notion de HEPT ne peut strictement s'appliquer à la chromatographie d'exclusion-diffusion. Elle donne cependant une idée de l'efficacité d'une colonne : plus sa valeur est petite, plus la colonne est efficace.

Son étude doit normalement s'effectuer à l'aide d'une substance homogène du point de vue moléculaire. Nous avons estimé pouvoir nous servir du pic III dont la symétrie est excellente.

in DETERMANN (H) - Gel chromatography. Springer-Verlag 1968

et Ib. Cette différence est liée à la méthode de détection choisie; l'absorptiomètre en continu donne en effet un profil général en fonction du temps sur des volumes de 0,045 ml (microcuve à alimentation continue). Les mesures spectrophotométriques sont réalisées sur des fractions qui font en moyenne 2,5 ml, ce qui nous conduit à une certaine intégration qui peut masquer les variations continues de la concentration de l'éluat en protéines.

En conclusion, nous avons choisi le Sephadex G-100, de faibles vitesses d'élution et un absorptiomètre en continu pour le contrôle des profils. Pour certaines comparaisons avec les résultats d'autres auteurs, nous utiliserons parfois le Sephadex G-75.

2° - Comparaison des profils d'élution

a) Profils ; Kav

La figure 35 permet de comparer sur G-100 les profils d'élution des parties transparentes des trois huîtres. Nous pouvons tirer les mêmes conclusions que sur plaque en ce qui concerne la position relative des pics et des zones, mais on observe un début de fractionnement du pic I et la présence d'un pic très retardé IV, ce qui n'apparaît pas sur plaque.

D'après le tableau XXVI, les Kav des pics homologues sont sensiblement les mêmes.

Sur la figure 36 reproduisant les profils d'élution des parties nacrées de C. angulata et d'O. edulis, on remarque la présence d'un important pic I et d'un faible pic III, homologue des pics I et III des parties transparentes. Le pic II de la partie transparente de C. angulata n'existe pas dans la partie nacrée. Ainsi sont corroborés les résultats sur plaque. Le tableau XXVII permet une comparaison des Kav.

Avec le myogène du muscle complet de C. angulata (figure 37), les résultats sur plaque sont aussi confirmés. Les Kav des pics figurent au tableau XXVII.

T A B L E A U XXVI

Valeurs des Kav des fractions des parties transparentes.

Kav	Pic III	Pic II	Pic I_b	Pic I_a
C. angulata Partie transparente	0,455	0,275	(0,088)	(0,014)
C. gigas Partie transparente	0,478	0,300	(0,033)	(0,010)
O. edulis Partie transparente	0,431		(0,070)	(0,011)

T A B L E A U XXVII

Comparaison des Kav

Kav	Pic III	Pic II	Pic IV_b	Pic IV_a
C. angulata Partie transparente	0,455	0,275	(0,088)	(0,014)
C. angulata Partie nacrée	0,406			(0,010)
C. angulata Myogène	0,489	0,317		
O. edulis Partie transparente	0,431		(0,070)	(0,011)
O. edulis Partie nacrée	0,456			(0,007)

b) Pourcentages des fractions

Les pourcentages des diverses fractions, du moins pour les parties transparentes et le myogène sont repris au tableau XXVIII. Les estimations faites sur l'éluat des colonnes et les estimations faites sur plaques montrent des discordances.

Ces différences peuvent s'expliquer de plusieurs façons :

- l'affinité du vert de lissamine pour les protéines peut varier avec les diverses fractions,

- la technique d'empreinte que nous employons pour la révélation des couches minces peut amener des perturbations; les grosses molécules, qui constituent la fraction 1, pénètrent peut-être moins facilement dans le papier-filtre que les molécules plus petites des fractions 2 et 3,

- la fente du densitomètre, de dimension fixe, analyse toujours une même surface quelle que soit l'aire de la tache étudiée; la fraction 2 peut ainsi être surestimée et la fraction 1 sous-estimée,

- la loi de Lambert-Beer n'est peut-être pas respectée sur toute la longueur du chromatogramme.

Pour les colonnes, le contenu de chaque tube du collecteur a été analysé par spectrophotométrie à une longueur d'onde bien définie et sans l'intervention d'une substance colorante. Les pourcentages ainsi obtenus sont peut-être plus proches de la réalité.

Devant le nombre de paramètres qui interfèrent lors de l'estimation sur plaque, les résultats peuvent évidemment être discutés. Cependant, il faut noter la rapidité de la méthode et sa bonne reproductibilité dont rend compte le calcul statistique.

T A B L E A U XXVIII

Pourcentages des fractions de divers extraits.

%	Ia et Ib	II ou z	III
C. angulata Partie transparente	48	14	38
C. gigas Partie transparente	44	17	39
O. edulis Partie transparente	47	10	43
C. angulata Myogène	26	21	53

3° - Particularités de quelques fractions

Il nous semble intéressant de faire quelques commentaires sur les diverses fractions.

a) Fractions I, II et III

L'observation des fractions fait apparaître l'excellente symétrie du pic III pour les parties transparentes, les parties nacrées et le myogène. La symétrie du pic II est moins parfaite. La fraction I subit un début de dédoublement et il n'existe plus aucune symétrie.

WARBURG et CHRISTIAN (260), par l'étude du rapport E 280/E 260, ont estimé les quantités d'acides nucléiques contaminant les protéines. Par analogie, nous avons établi, au sommet de chaque pic, le rapport 280/259. Nous connaissons les limites de cette méthode qui dans notre étude ne peut nous amener qu'à une estimation grossière des pourcentages d'acides nucléiques. D'après les chiffres trouvés, repris au tableau XXIX, les fractions I sont contaminées; par contre, les fractions II et III ne contiennent que très peu ou pas d'acides nucléiques.

Nous avons tracé point par point les spectres des fractions III des parties transparentes de C. angulata et d'O. edulis entre 210 et 330 mμ, en tampon phosphate de pH 7,5. Les portions examinées sont prélevées à la base des pics III. Les spectres sont présentés sur la figure 38. L'absorption très forte dans la zone 210-234 mμ est due aux liaisons peptidiques. On note la présence d'un minimum à 250 mμ et d'un maximum à 279-280 mμ. Ce maximum indique la présence de tyrosine et de tryptophane. Les épaulements visibles vers 278 et 287 mμ sont certainement ceux du tryptophane, comme le montrent les spectres de divers amino-acides présentés par FROMAGEOT et SCHNEK (62). Nos spectres sont donc des spectres "classiques" de protéines.

b) Fraction IV

Les fractions IV (et IVa, IVb) présentent des caractères spéciaux.

TABLEAU XXIX

Rapports $\frac{280}{259}$ et % en acides nucléiques.

		Crassostrea angulata			C. gigas	Ostrea edulis	
		Partie transparente	Partie nacrée	Myogène	Partie transparente	Partie transparente	Partie nacrée
I_a	$\frac{280}{259}$	0,985	1,186	1,636	1,066	1,069	1,549
	%	3,5	2	0,25	# 2,75	# 2,75	0,5
I_b	$\frac{280}{259}$	1,08		1,636	1,176	1,179	
	%	2,5		0,25	# 2	# 2	
II	$\frac{280}{259}$	1,718		1,838	1,867	1,481	
	%	# 0		0	0	# 0,5	
III	$\frac{280}{259}$	1,709	1,34	1,747	1,747	1,625	1,511
	%	# 0	# 1	0	0	0,25	# 0,5

Leur position sur le diagramme d'élution est anormale et leur spectre ultraviolet n'est pas celui d'une protéine. Rappelons que ces fractions ne sont pas révélées sur plaque par le vert de lissamine.

Le pic IV de la partie transparente de C. angulata et de C. gigas et de la partie nacrée de C. angulata est bien symétrique, tant sur G-75 que sur G-100. En suivant la conductivité et le pH, on remarque que sa sortie est précédée par un léger abaissement de pH et surtout par une augmentation bien marquée de la conductivité : Le pic IV sort après le pic de sel qui normalement signe la fin d'une chromatographie d'exclusion-diffusion de protéines.

La fraction IV de la partie transparente et de la partie nacrée d'O. edulis se scinde en deux pics IVa et IVb, et entre ces deux pics, on détecte une diminution du pH et une augmentation très nette de la conductivité. Le pic de sel se situe donc ici entre les pics IVa et IVb.

Les fractions IV et IVb absorbent bien plus à 259 qu'à 280 mμ; cette différence est peu marquée pour le pic IVa. Alors que la réaction du biuret est positive pour le pic III, elle est négative pour le pic IV.

Sur les spectres, entre 210 et 330 mμ (figure 38), pour les pics IV et IVb, on observe un minimum vers 226-228 mμ, un maximum à 259 mμ, en tampon-phosphate, pH 7,5. Dans les mêmes conditions, le pic IVa présente un minimum à 240-242 mμ et un maximum vers 267-270 mμ. Les pics IV et IVb ne sont donc pas des protéines et nous n'avons pas encore élucidé leur constitution. Ce pourrait être de l'ATP et de l'AMP, constituants normaux des tissus musculaires; leur maximum d'absorption est à 259 mμ et si l'on se réfère au travail de GELOTTE (64), les dérivés puriques sont retardés, du moins sur G-25. C'est le cas des pics IV et IVb sur G-75 et G-100; ils sortent après le pic de sel.

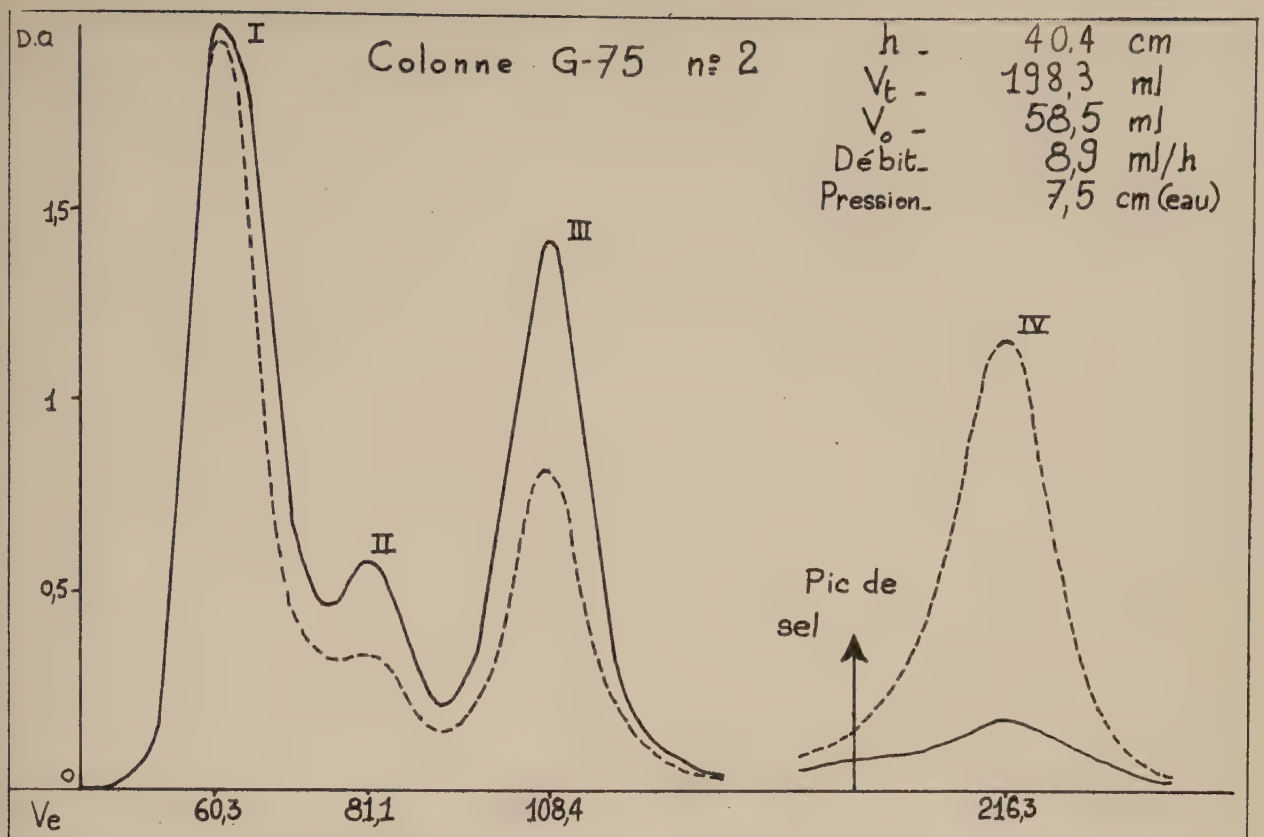


Figure 33a.- Profil d'élution d'un extrait de la partie transparente de l'adducteur de C. angulata.
(280 mμ —— ; 259 mμ ----)

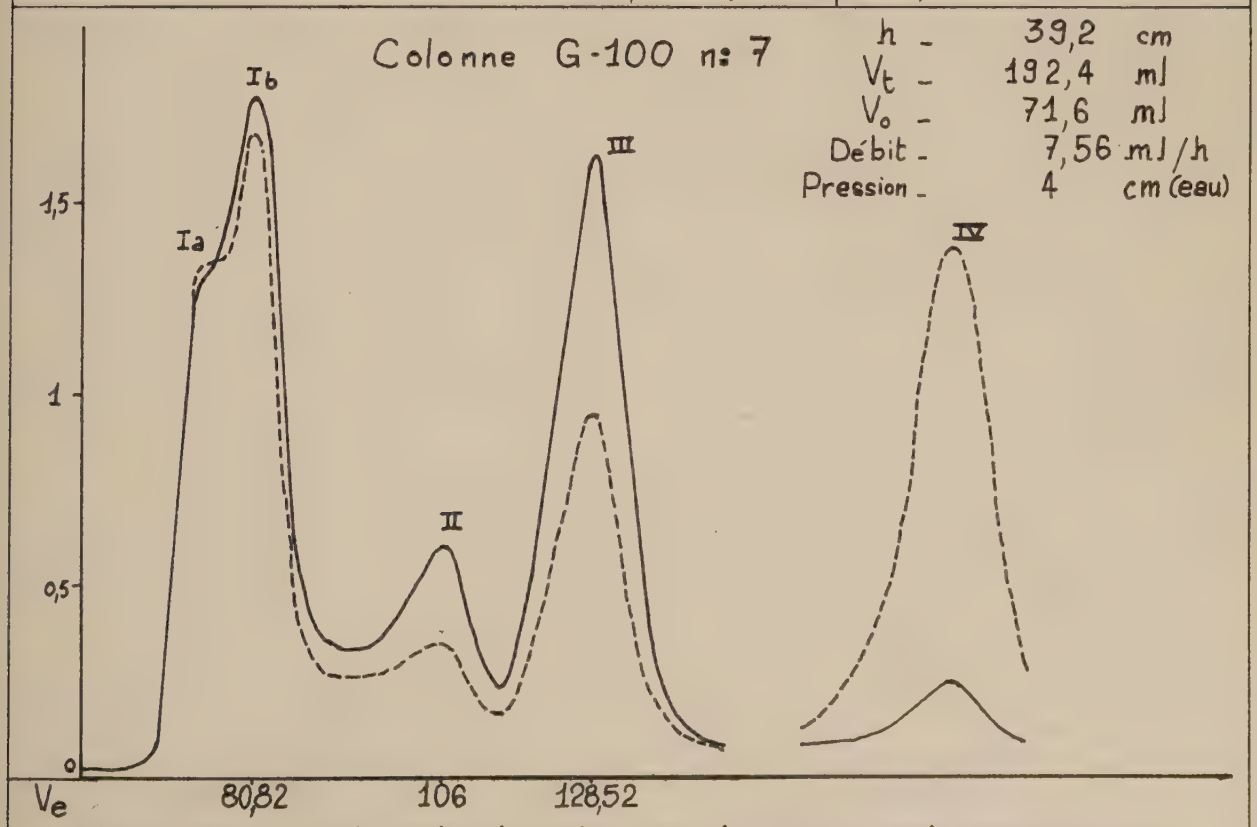


Figure 33b.- Profil d'élution d'un extrait de la partie transparente de l'adducteur de C. angulata.
(280 mμ —— ; 259 mμ ----)

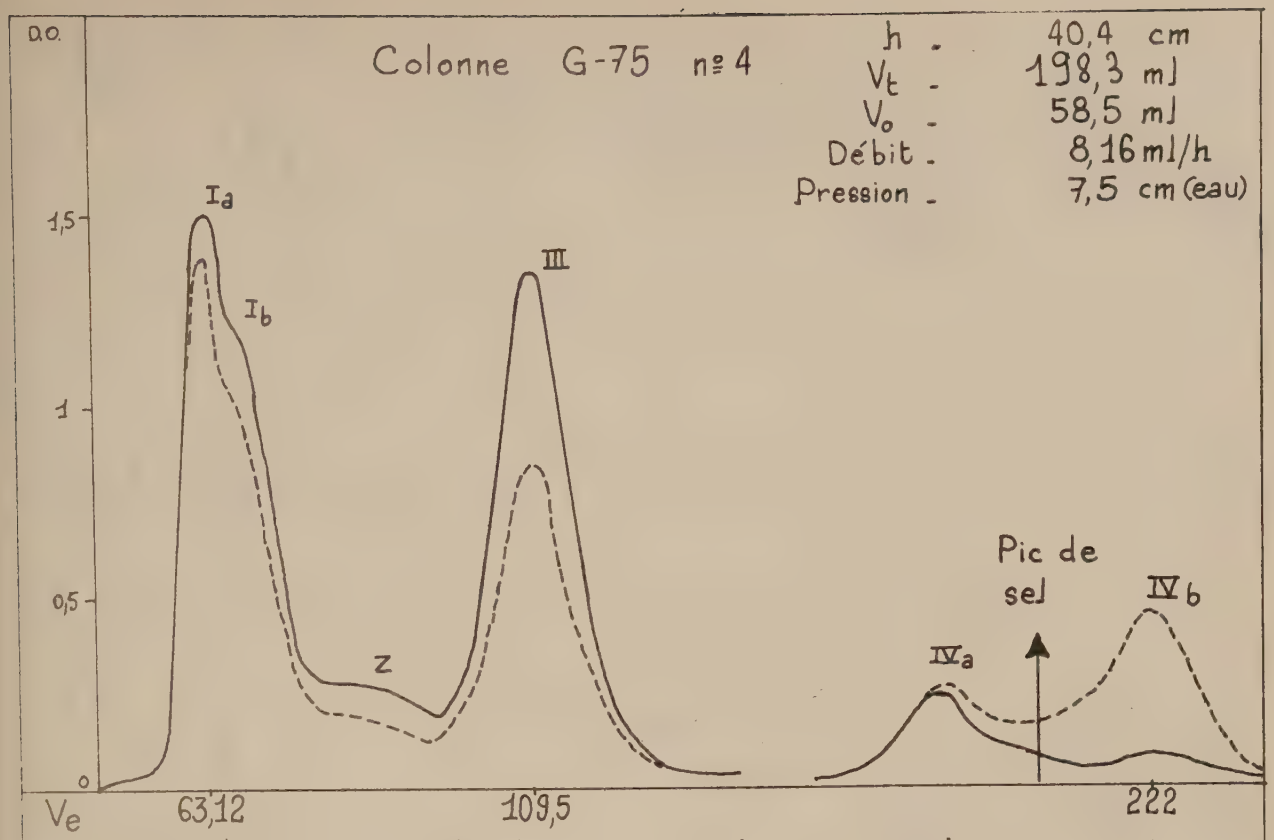


Figure 34a.- Profil d'élution d'un extrait de la partie transparente de l'adducteur de O. edulis
(280 mμ —— ; 259 mμ ---)

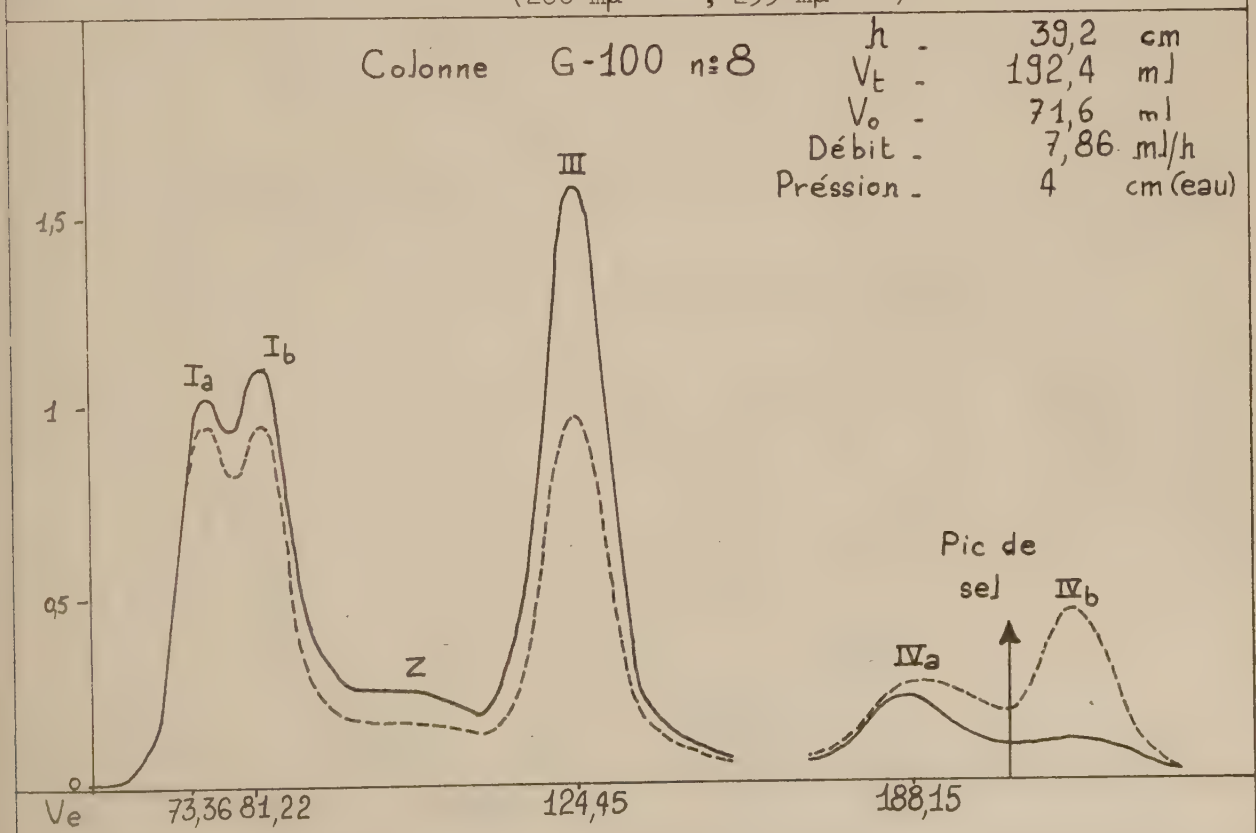


Figure 34b.- Profil d'élution d'un extrait de la partie transparente de l'adducteur de O. edulis.
(280 mμ —— ; 259 mμ ---)

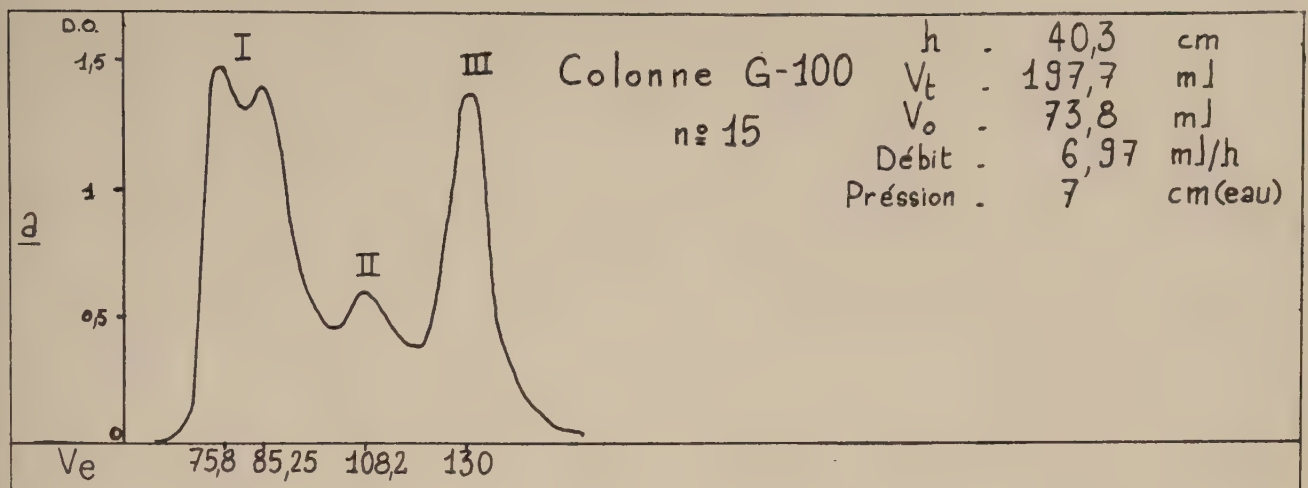


Figure 35a.- Profil d'élution d'un extrait de la partie transparente de l'adducteur de C. angulata.

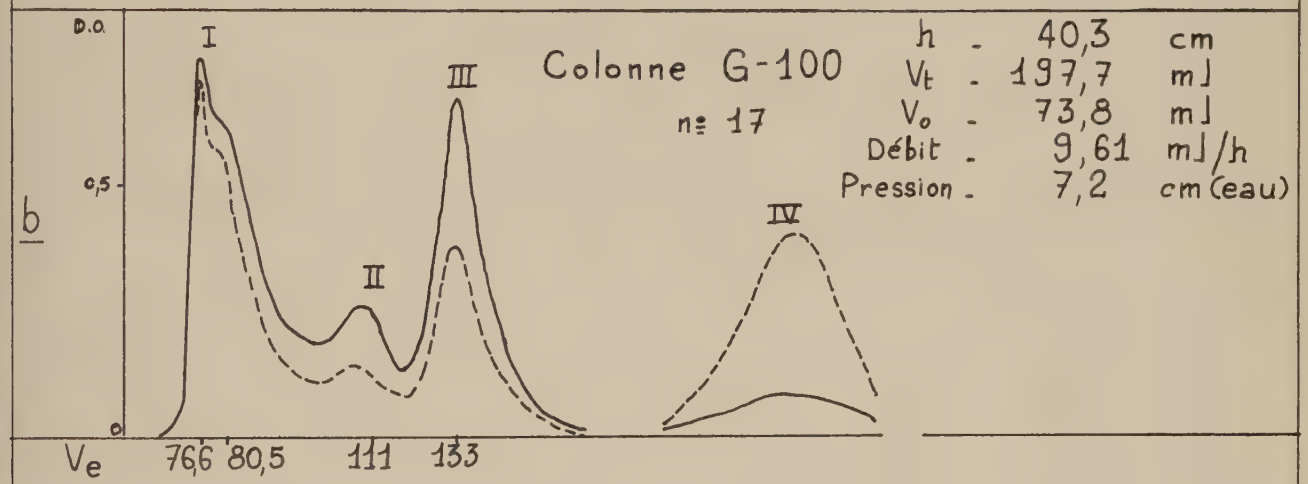


Figure 35b.- Profil d'élution d'un extrait de la partie transparente de l'adducteur de C. gigas.

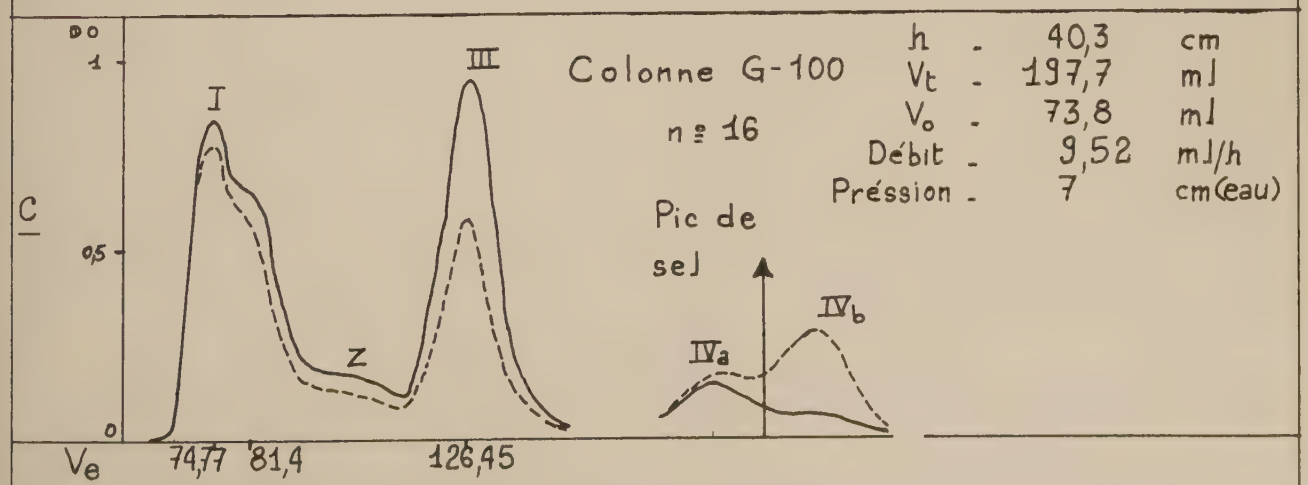


Figure 35c.- Profil d'élution d'un extrait de la partie transparente de l'adducteur de O. edulis.

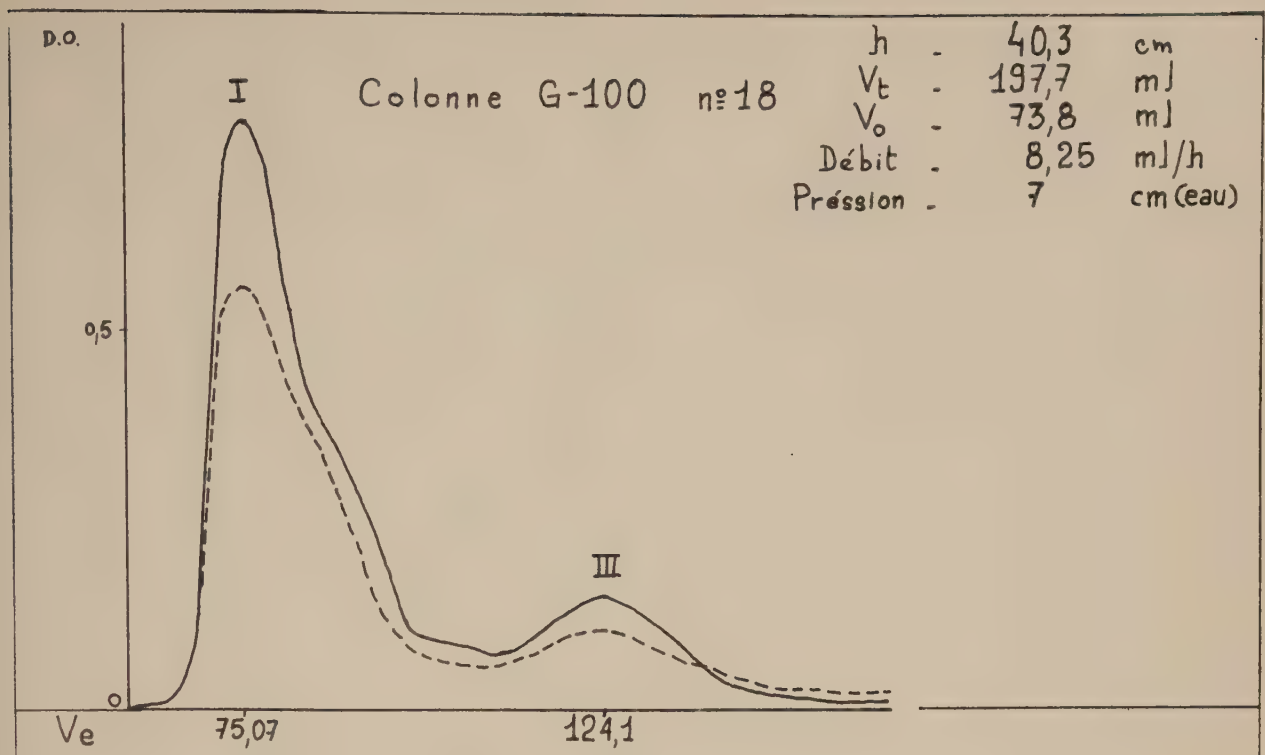


Figure 36a.- Profil d'élution d'un extrait de la partie nacrée de l'adducteur de C. angulata.

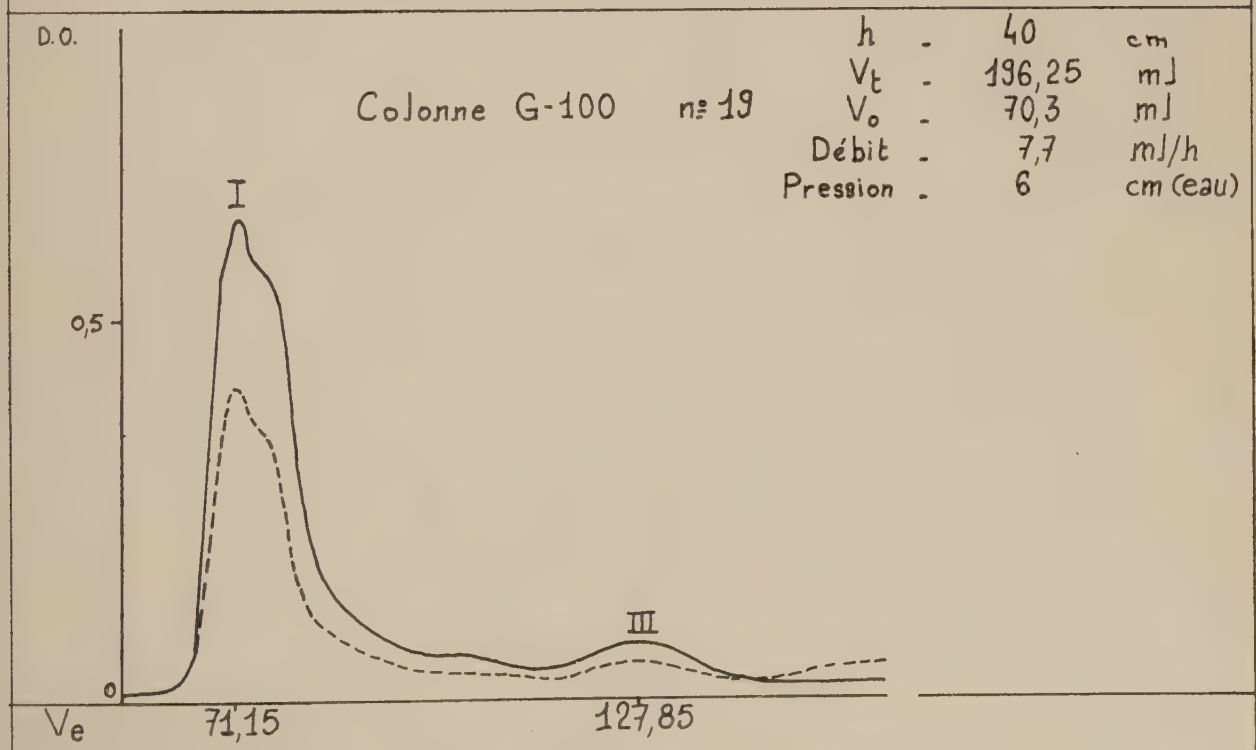


Figure 36b.- Profil d'élution d'un extrait de la partie nacrée de l'adducteur de O. edulis.

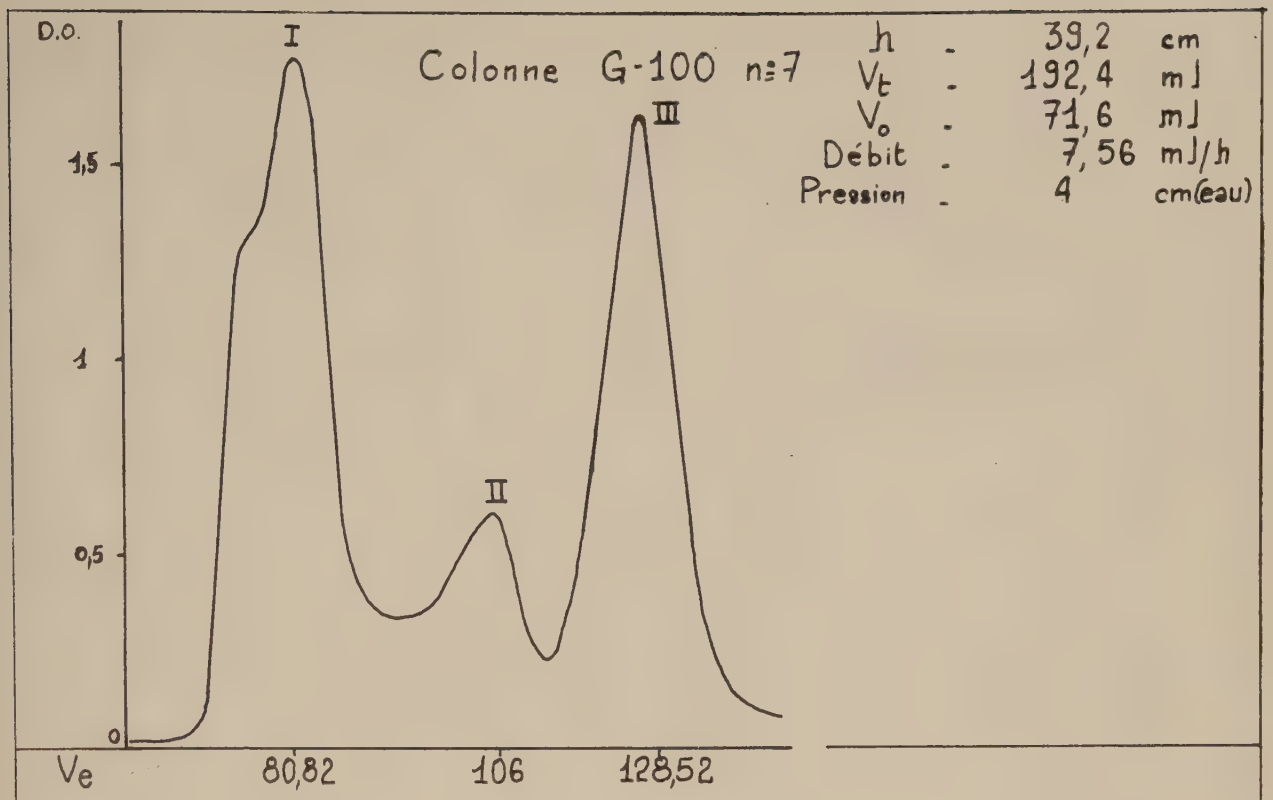


Figure 37a.- Profil d'élution d'un extrait de partie transparente de l'adducteur de C. angulata.

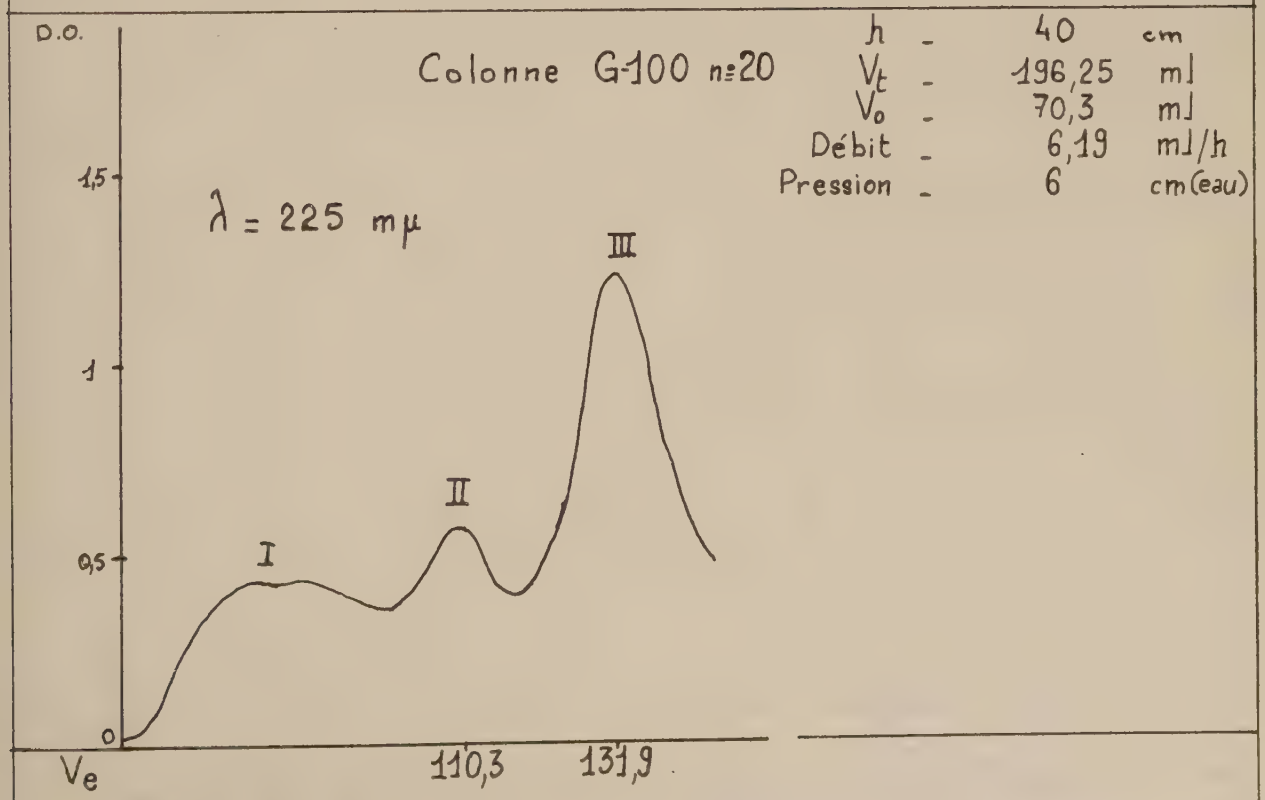


Figure 37b.- Profil du myogène du muscle complet de C. angulata.

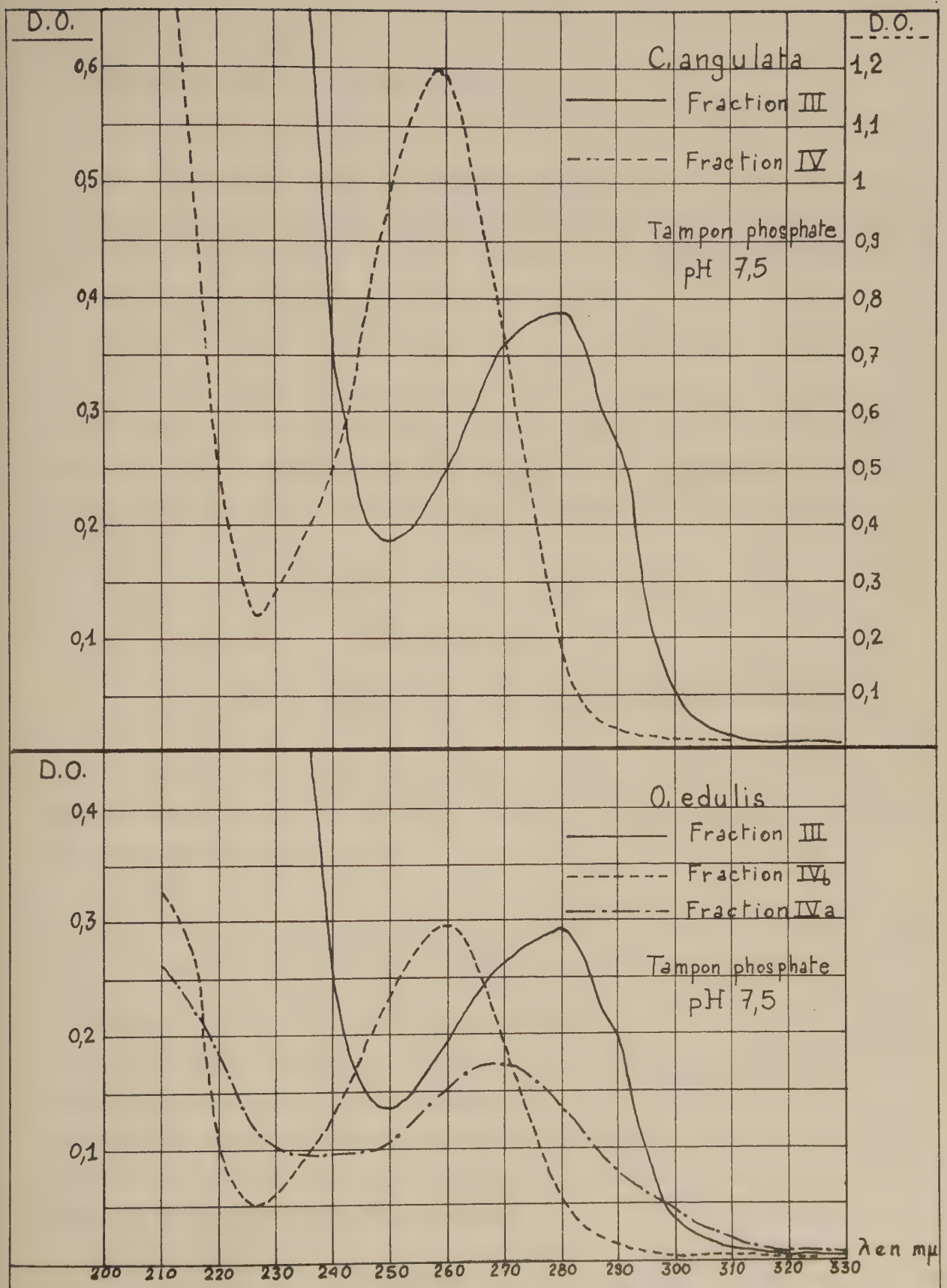


Figure 38.- Spectres de diverses fractions d'extraits de parties transparentes chromatographiés sur colonne de Sephadex.

C - ESTIMATION DES POIDS MOLECULAIRES

Nous avons estimé les poids moléculaires, aux maxima des pics sur plaque et sur colonne, dans des chromatographies standardisées à l'aide de protéines de référence de poids moléculaires relativement bien établis (3).

Estimation sur plaque

Nous avons fait de nombreuses standardisations sur les divers Sephadex (156). Nous n'exposerons ici que les résultats obtenus sur G-100, pour les parties transparentes d'*O. edulis* et de *C. angulata*. Douze substances de référence ont été employées et le calcul a été effectué selon la formule :

$$R_b = k \log M$$

k = constante

M = poids moléculaire

$$R_b = \frac{\text{déplacement de la fraction protéique étudiée}}{\text{déplacement du bleu dextran 2000}}$$

Nous avons remarqué la grande reproductibilité de R_b, ce qui confirme le bien fondé de notre choix. C'est l'analogue du rapport Ve/Vo employé en chromatographie sur colonne.

Sur une plaque (20 x 20 cm), nous faisons migrer l'extrait à étudier, encadré de six protéines de référence de poids moléculaires croissants. De part et d'autre, migre le bleu dextran 2000. Nous déposons sur la ligne de départ un volume d'extrait correspondant à 35 µg de protéines (détermination mentionnée au début de cette dernière partie). Les volumes des solutions protéiques de référence sont en général de 2 µl correspondant à 10 µg de protéine. Le liquide de développement est le tampon phosphate de pH 7,5 et de force ionique 0,05. Le temps de migration est de 3 h. La figure 39 représente des chromatogrammes de *C. angulata*.

Les protéines de référence et leurs caractéristiques sont présentées

au tableau XXX et les résultats au tableau XXXI et à la figure 40. Les R_b des fractions sont reportés sur le diagramme d'étalonnage.

Le poids moléculaire au maximum de la fraction 3 est de l'ordre de 18.600 pour la partie transparente de C. angulata et d'O. edulis. Au maximum de la fraction 2 de C. angulata, il est de l'ordre de 33.000. Une partie des protéines de nos extraits séparés sur G-100 se répartit ainsi d'une façon homogène autour de ces deux poids moléculaires. Il est à noter que les poids moléculaires trouvés se rapprochent de ceux de la myoglobine et de son dimère.

Evidemment, les protéines de référence ne sont pas toutes d'égale valeur pour la standardisation. La trypsine et l'α-chymotrypsinogène s'écartent toujours de la droite de référence. La pepsine semble plutôt migrer comme son dimère. L'hémoglobine migre comme une demi-molécule; son comportement a été étudié en fonction du pH et de la force ionique par ANDREWS (2). En reportant les R_b de la pepsine et de l'hémoglobine sur notre courbe de standardisation, nous leur trouvons des poids moléculaires respectivement de 72.400 et 39.800.

Estimation sur colonne

Nous standardisons une colonne de Sephadex G-100 avec des protéines de référence. Dans un millilitre de tampon, on dissout 1 mg de bleu dextran, 5 mg d'ovalbumine et 3 mg de chacune des protéines suivantes : myoglobine, inhibiteur de la trypsine (extrait du soja), ribonuclease, inhibiteur de la trypsine (extrait de la fève de Lima). Ce mélange est déposé sur une colonne dont la hauteur de gel est de 39,2 cm. Le tampon d'élution est le tampon phosphate de pH 7,5 et de force ionique 0,05. Le débit est de 8 ml/h. Les fractions sont recueillies sur le collecteur. L'éluat est analysé par spectrophotométrie à 280, 230 et 407 mμ. Le bleu dextran et l'ovalbumine sont détectés à 280 mμ; les inhibiteurs de la trypsine et la ribonucléase répondent mal à cette longueur d'onde et sont précisés à 230 mμ. La myoglobine et son dimère sont des protéines colorées ayant un maximum d'absorption à 407 mμ. A cette longueur d'onde, les autres protéines n'absorbent pas; on

obtient les pics bien individualisés de cette substance et de son dimère. Les volumes d'élutions de l'inhibiteur de la trypsine (soja) et de la ribonucléase ont été précisés par une seconde standardisation.

La figure 41 représente le profil d'élution aux diverses longueurs d'onde et les éléments permettant les calculs selon la formule (262) :

$$\frac{Ve}{Vo} = k \log M$$

Ve = volume d'élution au sommet du pic considéré
Vo = volume mort de la colonne
k = constante
M = poids moléculaire

La figure 42 donne la courbe de standardisation. On remarque le comportement anormal de l'inhibiteur de la trypsine (soja).

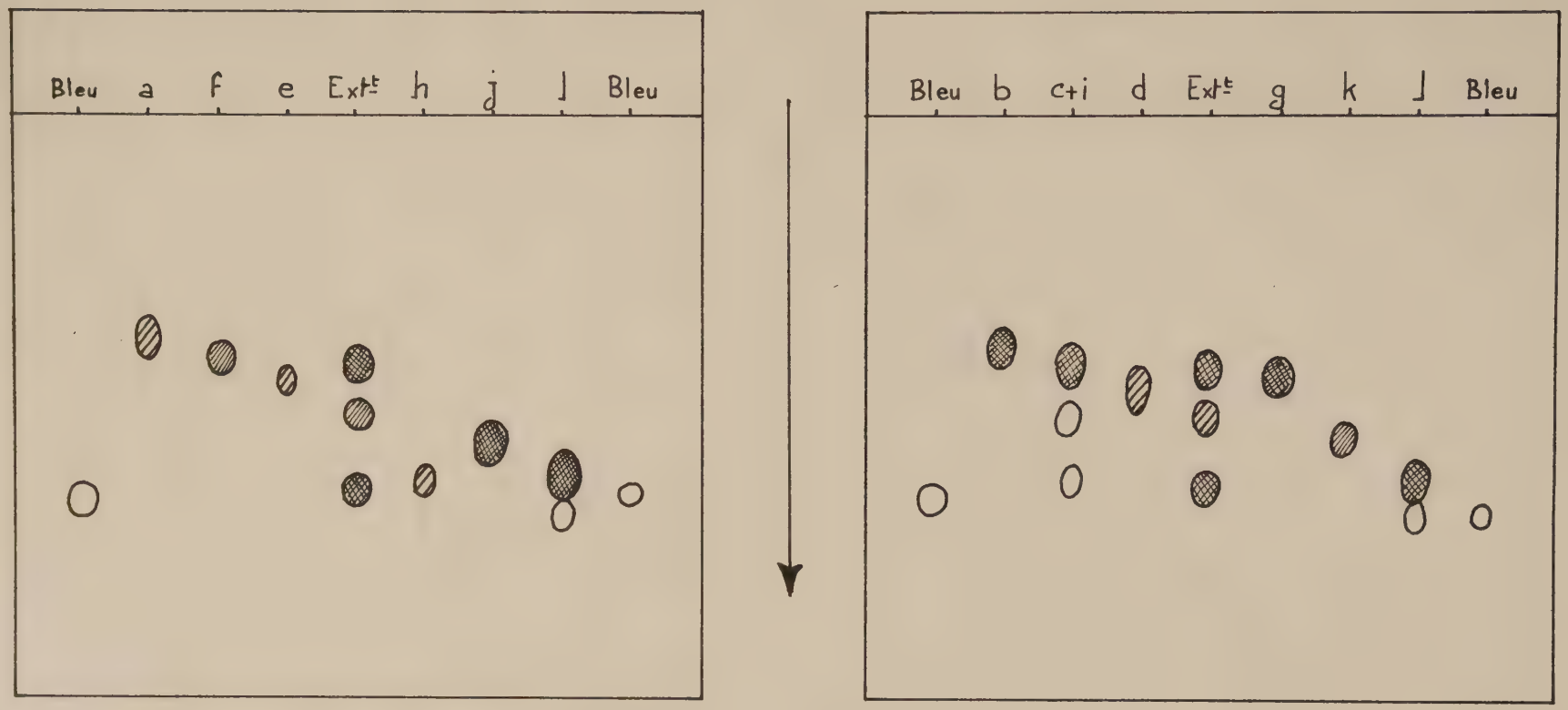
Sur le tableau XXXII figurent les résultats pour les parties transparentes de C. angulata et d'O. edulis. Nous constatons une surestimation des poids moléculaires par rapport à ceux trouvés sur plaque. Nous ne pouvons dire encore lesquels se rapprochent le plus de la réalité. Sur plaque, nous avons l'avantage de mesurer les R_b des protéines de référence migrant individuellement et de pouvoir procéder à des séries de mesures en des temps relativement courts. Sur colonne, pour ne pas augmenter inconsidérément le temps de standardisation (qui dure 26 heures), nous plaçons un mélange de protéines de référence avec tous les aleas que cela comporte, notamment les interactions entre les protéines.

Nous devons souligner que tous les auteurs ne sont pas d'accord sur les poids moléculaires des protéines de référence. ANDREWS (2) considère que l'incertitude maximum des valeurs estimées sur colonne pour des protéines globulaires est de ± 10 % pour des poids moléculaires compris entre 10.000 et 150.000.

Il est remarquable que les fractions III, II et Ib se répartissent respectivement autour des valeurs 20.000 - 40.000 - 80.000, donc comme les facteurs (1 x), (2 x), (4 x).

TABLEAU XXX

	Protéines de référence			
	Noms	M	log M	Rb
a	Cytochrome C	12.500	4,097	0,58
b	Ribonucléase	13.700	4,137	0,59
c	Myoglobine	17.800	4,250	0,65
d	Inhibiteur trypsine (soja)	21.500	4,332	0,69
e	α chymotrypsine	22.500	4,352	0,70
f	Trypsine	24.000	4,380	0,63
g	α chymotrypsinogène	25.000	4,398	0,68
h	Pepsine	35.500	4,550	0,95
i	Myoglobine dim.	35.600	4,551	0,78
j	Ovalbumine	45.000	4,653	0,85
k	Hémoglobine	64.000	4,809	0,82
l	Albumine	67.000	4,826	0,93



Sephadex G-100
"superfine"

Figure 39.- Chromatographies d'un extrait de partie transparente de muscle adducteur de C. angulata et de diverses protéines de référence (Cf Tableau XXX)
On peut remarquer le dimère de l'albumine (l) et les dimère et trimère (?) de la myoglobine (i)

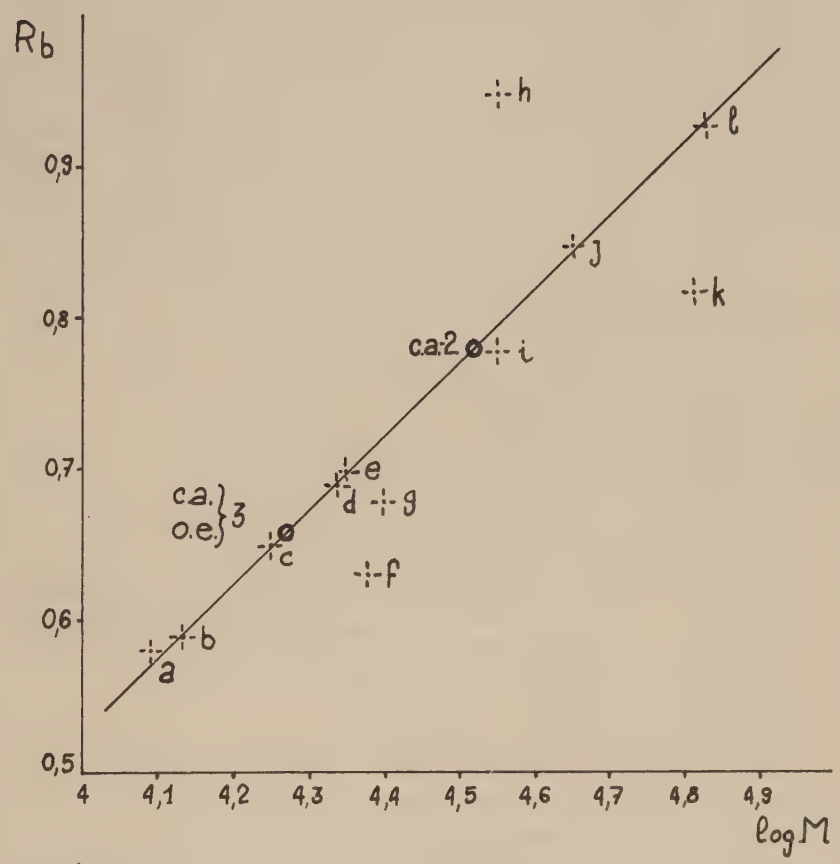
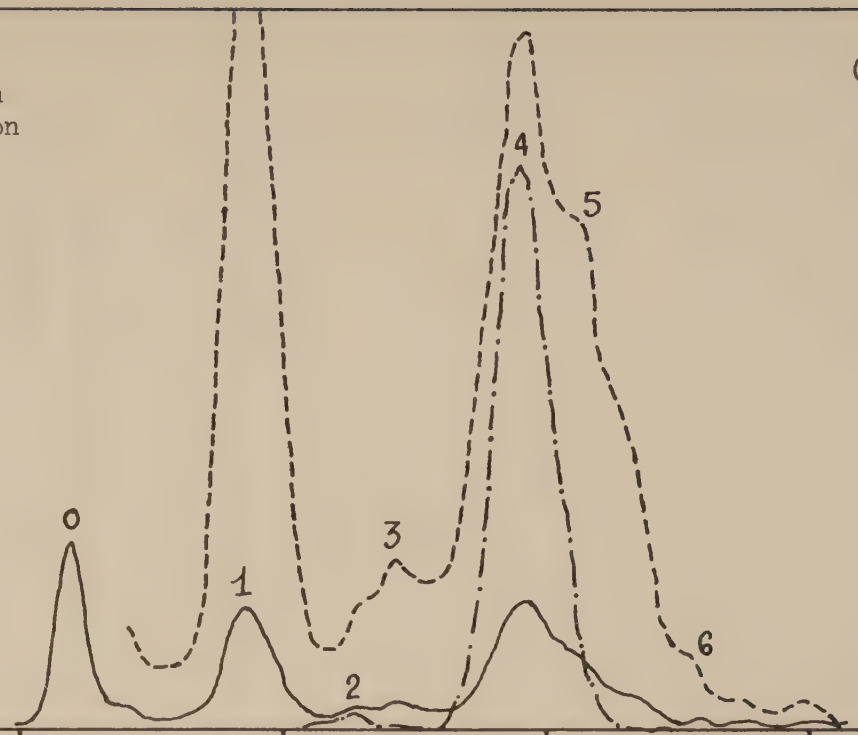


Figure 40.- Courbe de standardisation sur plaque

		Fraction 2	Fraction 3
R_b	C. angulata O. edulis	0,78	0,66 0,66
Log M	C. angulata O. edulis	4,52	4,27 4,27
M	C. angulata O. edulis	33.000	18.600 18.600

TABLEAU XXXI : Estimation des poids moléculaires sur plaque.

Figure 41.- Profil d'élution permettant la standardisation de la colonne.



N°	1	2	3	4	5	6
Protéines de référence	Ovalbumine	Myoglobine (dimère)	Inhibiteur Trypsine (soja)	Myoglobine (monomère)	Ribonuclease	Inhibiteur Trypsine (fève de Lima)
M	45.000	35.600	21.500	17.800	13.700	9.000
log M	4,653	4,551	4,332	4,250	4,137	3,954
Ve/Vo	1,37	1,57	1,65	1,90	2,02	2,24

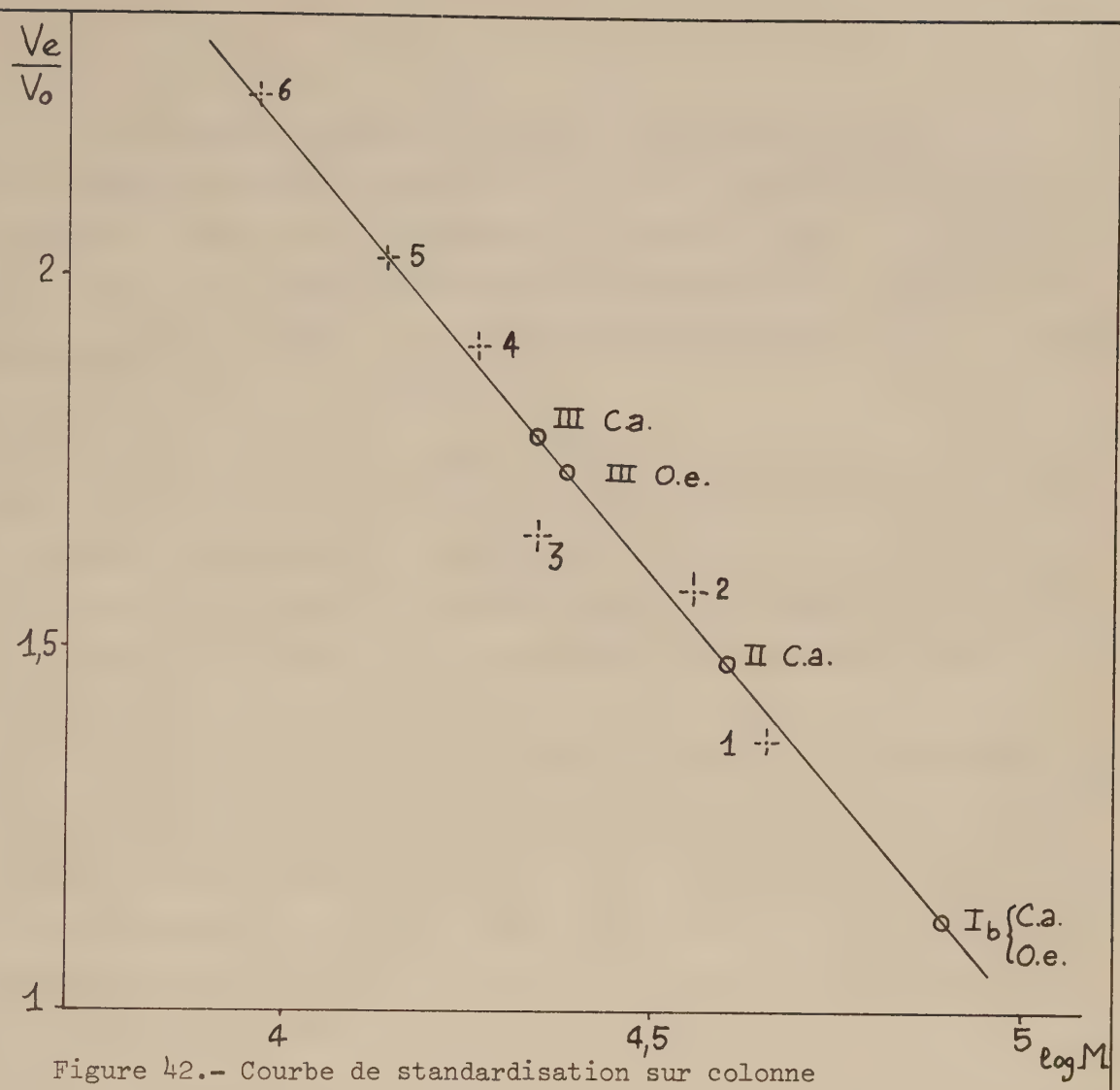


Figure 42.- Courbe de standardisation sur colonne

		I_b	II	III
Ve/Vo	C. angulata O. edulis	1,13 1,13	1,48	1,79 1,74
log M	C. angulata O. edulis	4,89 4,89	4,59	4,33 4,375
M	C. angulata O. edulis	77.600 77.600	38.900	21.500 23.700

TABLEAU XXXII : Estimation des poids moléculaires sur colonne.

La chromatographie d'exclusion-diffusion fournit des profils de formes identiques sur plaque et sur colonne; les positions des fractions se correspondent. Cependant, la technique sur colonne, outre son caractère préparatif, peut fournir des informations que ne donne pas la technique sur plaque : différenciation du pic I en deux sous-fractions Ia et Ib et détection d'une fraction IV non protéique.

L'importance relative des fractions, obtenues sur plaque ne concorde pas toujours avec celles obtenues sur colonne. Il ne nous est pas encore possible d'expliquer ces différences. Les résultats sur colonne sont probablement plus proches de la réalité. Nous conserverons cependant les résultats obtenus sur plaque, car la reproductibilité est excellente.

L'estimation des poids moléculaires réalisée sur plaque étant de l'avis d'auteurs autorisés (2) moins proche de la réalité que celle obtenue sur colonne, nous retiendrons les chiffres obtenus par cette dernière technique. Il faut cependant remarquer, dans l'une comme dans l'autre technique, une répartition des poids moléculaires autour des valeurs : 20.000 (faibles poids moléculaires), 40.000 (poids moléculaires moyens) et 80.000 (poids moléculaires élevés).

Divers auteurs ont pensé que les protéines pouvaient ainsi se répartir en classes. WRIGHT (272) en 1962, a tenté de grouper les enzymes en trois séries géométriques selon leurs poids moléculaires. Il rappelle un travail de SVEDBERG suggérant que les protéines globulaires pouvaient se ranger en classes discrètes selon leurs poids moléculaires, les moyennes de chaque classe étant des multiples de 17.600. En 1966, SOROF et ses collaborateurs (234) ont résolu par chromatographie d'exclusion-diffusion les macromolécules solubles du foie en huit classes selon leurs tailles.

Les profils chromatographiques des protéines solubles des parties transparentes du muscle adducteur des Crassostrea se ressemblent beaucoup; celui d'O. edulis en diffère par sa faible teneur en protéines de poids moléculaires moyens.

Par contre, les profils des protéines solubles des parties nacrées de C. angulata, de C. gigas et d'O. edulis sont très proches. Pour ces trois espèces, les protéines de poids moléculaires moyens sont absentes.

Il est donc possible de mettre en parallèle les différences et les analogies observées dans la répartition des poids moléculaires avec celles, de nature physiologique, que nous avons déjà exposées au tableau VII. La partie nacrée, tonique, joue surtout un rôle de défense dans les trois espèces d'huîtres; la partie transparente, phasique, possède une fonction plus complexe, légèrement différente d'un genre à l'autre.

La faible teneur en protéines de poids moléculaires moyens de certains extraits ne peut être due à une perte à la dialyse qui affecterait en premier lieu les protéines de faibles poids moléculaires, ce qui n'est pas le cas. On peut évoquer des différences dans l'extractibilité de certaines protéines, ce qui, d'ailleurs, est en soi significatif. Nous avons effectué des extractions de la partie transparente du muscle adducteur d'O. edulis à une force ionique de 0,15, ce qui amène une augmentation de la teneur en protéines totales de l'extrait, mais ne modifie pas l'aspect chromatographique.

L'étude du myogène et de la globuline X montre le caractère plutôt albuminique des fractions III et II et plutôt globulinique de la fraction I. Si les protéines solubles des parties transparentes sont de nature albuminique et globulinique, celles des parties nacrées sont en majeure partie globuliniques.

III - APPLICATIONS DE L'ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE ET EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.

A - ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE GELATINEUX

Nos extraits ont été fractionnés par électrophorèse sur acétate de cellulose gélatineux et en gel de polyacrylamide. Sur acétate de cellulose, nous avons utilisé le plus souvent un tampon Tris-glycine, de pH 8,5. Nous décrirons les électrophorégrammes de chaque espèce, colorés au noir amide, et les comparerons. Nous indiquerons ensuite les variations qui résultent de l'emploi de tampons différents et nous évoquerons la méthode préparative.

1° - Description des électrophorégrammes

Des échantillons correspondant à 50 µg de protéines sont déposés sur une largeur de 1 cm, à 4 cm du centre de la bande d'acétate, vers la cathode. Les résultats sont réunis sur la figure 43.

a) *Crassostrea angulata*

Le muscle complet de *C. angulata* se fractionne en dix bandes prolongées vers l'anode par une zone colorée uniformément. Les fractions sont régulièrement disposées. La bande centrale est particulièrement intense. Une fraction assez importante est restée sur la zone de départ. Il n'y a pas de bandes visibles entre la cathode et la zone de départ.

La partie transparente présente sensiblement le même aspect; la zone colorée anodique, qui est peut-être un artéfact pour le muscle complet, est ici résolue en trois bandes, ce qui donne treize fractions parmi les-

quelles on remarque dans la partie moyenne un groupe caractéristique de trois bandes plus intenses que les autres.

La partie nacrée se fractionne très mal, et en dépit de diverses variantes, nous n'avons pas réussi à améliorer son électrophorégramme. L'aspect électrophorétique est différent de ceux de la partie transparente et du muscle complet. Neuf bandes de faible intensité se répartissent sur un fond uniformément coloré. Deux des bandes migrent vers la cathode. Nous ne pensons pas que cette migration soit entièrement due au flux d'électro - osmose. Il n'existe qu'une faible trace au niveau du groupe caractéristique des trois bandes de la partie transparente.

Il semble que la présence de la partie nacrée,dans le muscle complet, perturbe légèrement son fractionnement.

b) Crassostrea gigas

Le muscle complet se fractionne en onze bandes dont deux bandes importantes et très colorées, suivies d'une troisième plus faible.

La partie transparente a treize bandes, comme pour C. angulata. Son aspect se rapproche étroitement de celui du muscle complet pour la disposition des bandes et leur intensité. Mais, le groupe des trois bandes caractéristiques est encore plus marqué que dans le muscle complet.

Pour la partie nacrée, les bandes, au nombre de neuf, sont très peu prononcées et deux d'entre elles migrent vers la cathode.

La figure 44 permet de comparer les tracés densitométriques de la partie transparente et de la partie nacrée de C. gigas. Les pics de la partie transparente sont bien nets. Les deux pics de plus grande amplitude et celui moins prononcé qui les suit correspondent au groupe des trois bandes caractéristiques dont nous avons parlé.

Le tracé densitométrique de la partie nacrée est en rapport avec

son fractionnement difficile; on note l'absence des trois bandes caractéristiques.

c) Ostrea edulis

Le fractionnement du muscle complet, probablement gêné par la présence de la partie nacrée, ne donne que cinq bandes et une zone anodique colorée de façon uniforme. Une des bandes est de forte intensité.

La partie transparente se sépare d'une façon satisfaisante. Elle donne sept bandes dont une de forte intensité correspondant à celle du muscle complet.

Pour la partie nacrée, le fractionnement est mauvais; il apparaît une traînée colorée et deux petites bandes inférieures rapides.

2° - Comparaison des parties transparentes

La comparaison des parties nacrées n'offre pas d'intérêt.

Sur les densitométries des parties transparentes, reprises à la figure 45, on remarque une certaine identité entre l'aspect général des deux Crassostrea, alors que celui d'O. edulis diffère nettement.

La région des trois bandes caractéristiques s'inscrit, chez C.angulata, sous la forme d'un pic de forte amplitude encadré de deux pics moins importants. Chez C. gigas, nous avons deux pics égaux de forte amplitude suivis d'un pic moins important. O.edulis ne possède à ce niveau qu'un pic très accusé, suivi d'un second mal défini.

3° - Résultats obtenus avec divers tampons

Nous avons tenté de séparer les diverses fractions de la partie transparente de C. gigas à l'aide de tampons différents de celui employé précédemment.

Aucun de ces tampons dont les formules figurent au tableau XXXIII ne donne de résultat très satisfaisant. Cependant, les électrophorégrammes de la figure 46 permettent quelques remarques intéressantes :

TABLEAU XXXIII

Tampons utilisés en électrophorèse sur acétate de cellulose
(à l'exception du tampon Tris-glycine de pH 8,5)

Tampons	pH	$\overline{2}$	Formules	
Acide acétique -	3,7	0,1	CH_3 COOH 1 M	900 ml
			CH_3 COONa $3H_2O$	13,6 g
			Eau distillée	q.s.p. 1.000 ml
Acétate de sodium	5,4	0,1	CH_3 COOH 1 M	16 ml
			CH_3 COONa 3 H_2O	13,6 g
			Eau distillée	q.s.p. 1.000 ml
Tris - HCl	7,2		Tris	6,06 g
			HCl 1N	44,2 ml
			Eau distillée	q.s.p. 1.000 ml
Glycine - NaOH	9,45	0,1	Glycine	23,27 g
			NaOH N	100 ml
			Eau distillée	q.s.p. 1.000 ml

- le nombre des fractions obtenues est toujours plus faible qu'avec le tampon Tris-glycine de pH 8,5,

- à pH 3,7 seule une faible fraction conserve une certaine mobilité,

- pour les autres pH, nous observons un certain nombre de fractions dont

la présence constante du groupe caractéristique de trois bandes, indiqué précédemment; entre ce groupe et la zone de départ, on trouve au maximum une bande.

Il est difficile de tirer des conclusions de ces essais, car un tampon d'électrophorèse n'agit pas seulement selon son pH, mais aussi suivant sa force ionique et sa composition.

4° - Méthode préparative

Nous verrons ultérieurement les résultats de la méthode préparative dont nous avons déjà exposé la technique (page 100). Nous dirons ici qu'un électrophorégramme préparatif, coloré au noir amide, montre le même aspect qu'un électrophorégramme analytique réalisé avec le même tampon. Rappelons que nous employons cette méthode pour isoler des fractions, sans les dénaturer; normalement, nous ne colorons pas cet électrophorégramme, mais uniquement son empreinte.

5° - Considérations générales

En résumé, l'acétate de cellulose permet de séparer nos extraits protéiques en un nombre de fractions relativement restreint.

Sur les électrophorégrammes, on remarque l'encombrement de la zone de départ et la présence d'un "tapis" coloré qui s'étend vers l'anode, et que nous n'avons pas réussi à éliminer, ce qui empêche une bonne densitométrie.

Les parties transparentes donnent les meilleurs résultats. On remarque la présence d'un groupe de trois bandes caractéristiques chez C.angulata et C. gigas qui se ressemblent beaucoup. L'électrophorégramme d'O.edulis est très différent.

Les parties nacrées se fractionnent difficilement, ce qui doit nuire à l'électrophorèse du muscle complet.

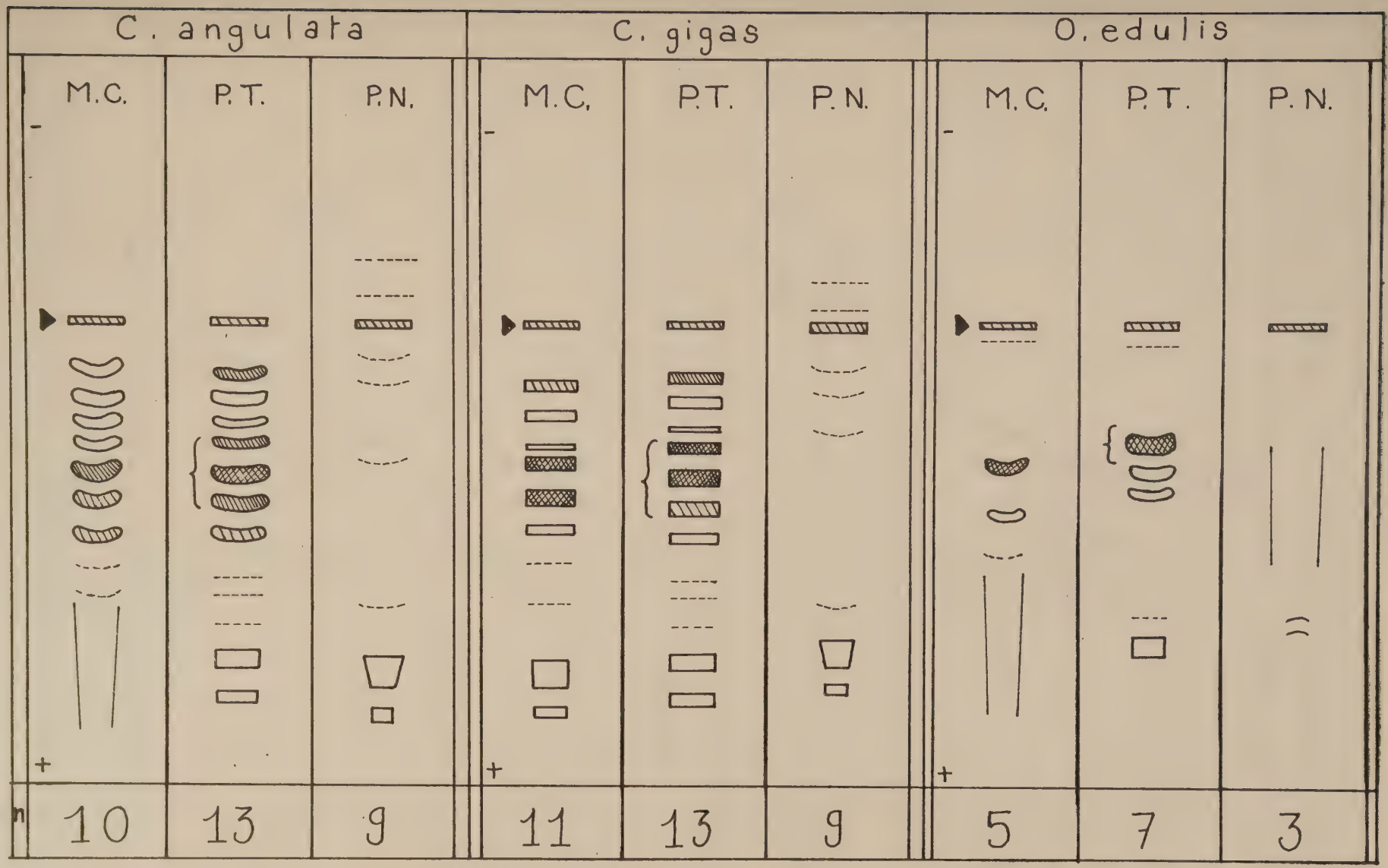


Figure 43.- Electrophorégrammes des divers extraits sur acétate de cellulose. Tampon Tris-glycine, pH 8,5.
(▶ - Dépot de l'échantillon ; ⌣ - Bandes caractéristiques ; n = nombre de fractions)

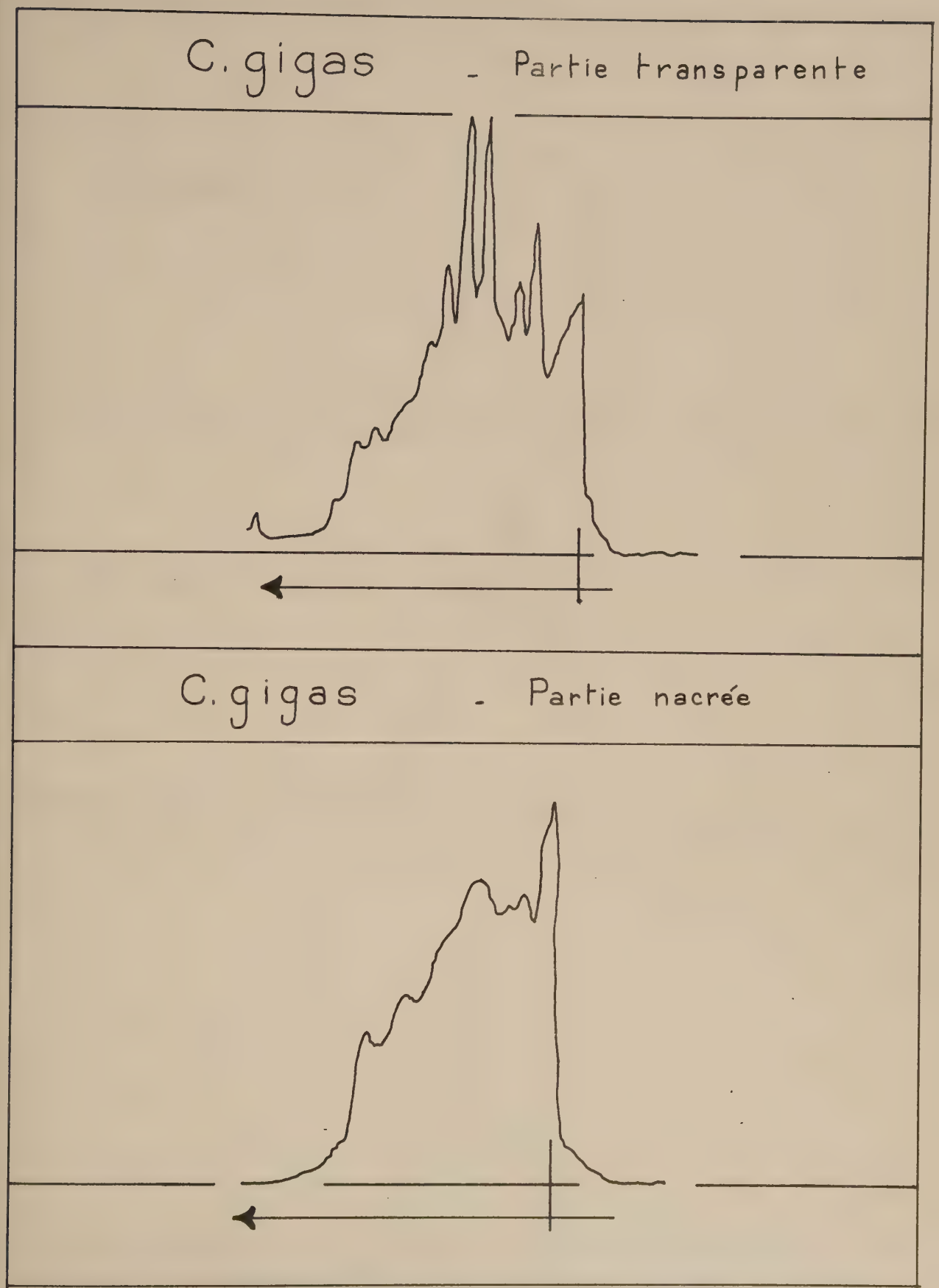


Figure 44.- Densitométries d'électrophorégrammes sur acétate de cellulose.

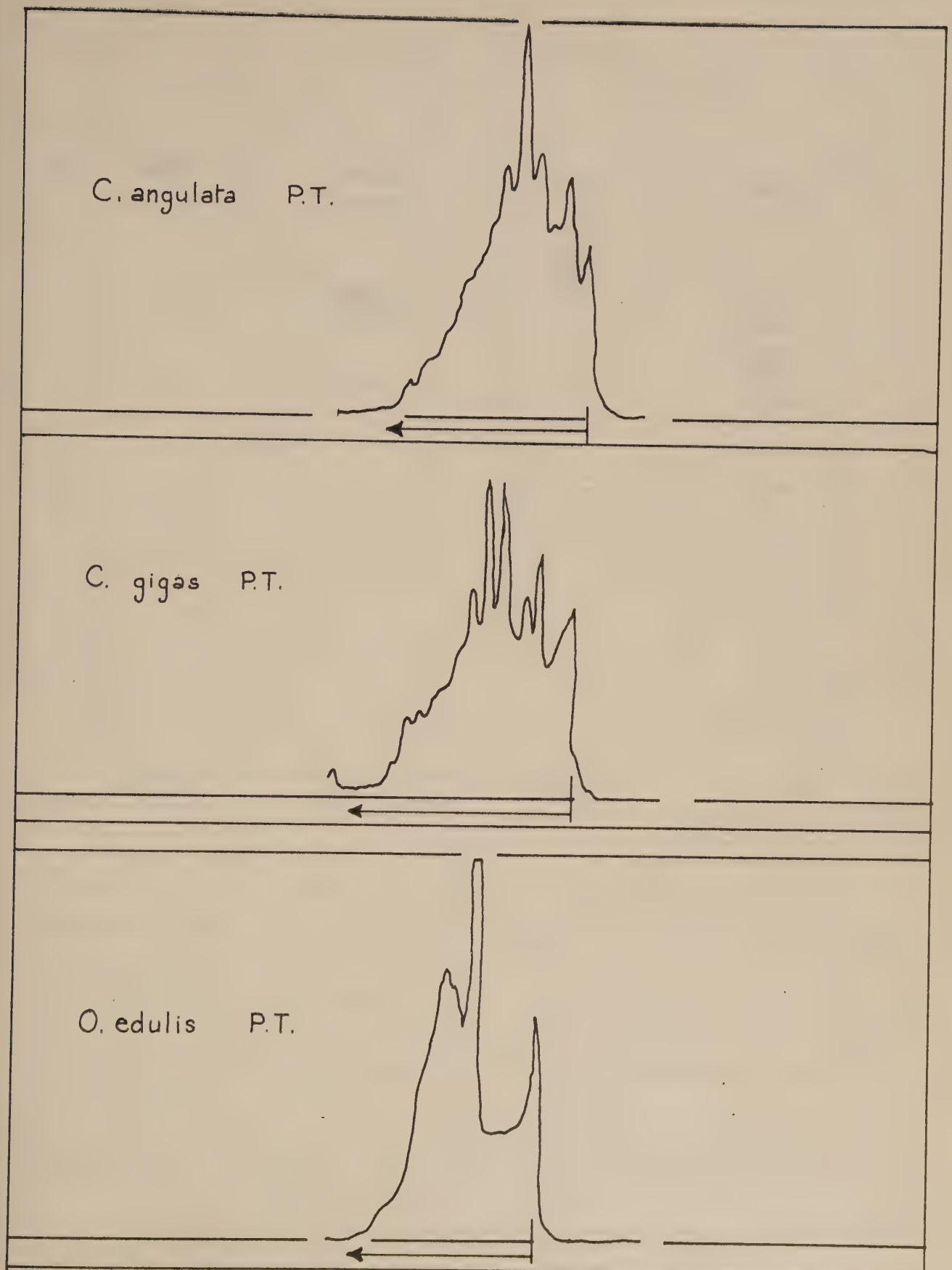


Figure 45.- Densitométries d'électrophorégrammes sur acétate de cellulose.
(Parties transparentes des trois huîtres)

pH 3,7 pH 5,4 pH 7,2 pH 9,45

Tampons	pH	$\frac{\Gamma}{2}$	Durée électrophorèse	V/cm
Acide acétique - acétate de sodium	3,7	0,1	1 H 30	15
	5,4	0,1	1 H 30	15
Tris - HCl	7,2		1 H	15
Glycine - Na OH	9,45	0,1	2 H 30	10

Figure 46.- Fractionnement de la partie transparente de C. gigas sur acétate de cellulose à l'aide de différents tampons.

Sur un plan général, on note une simplification de l'électrophorégramme suivant le schéma :

Muscles complets et Parties transparentes	C. angulata C. gigas	10 à 13 bandes
Muscles complets et Parties transparentes	O. edulis	5 à 7 bandes
Parties nacrées	C. angulata C. gigas O. edulis	3 à 9 bandes (faibles et mal définies)

B - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide, dont le pouvoir de résolution est plus élevé qu'en acétate de cellulose gélatineux, s'emploie de plus en plus pour le fractionnement analytique et préparatif des mélanges protéiques complexes.

Tout au long de notre thèse, nous avons cité plusieurs auteurs appliquant cette méthode au fractionnement des protéines musculaires solubles dans les solutions salines de faible force ionique. Les travaux sur les muscles des mollusques sont peu nombreux; ils intéressent les gastéropodes et non les bivalves.

Nous allons présenter les électrophorégrammes des trois espèces, nous comparerons ensuite les espèces entre elles, puis nous étudierons quelques cas particuliers.

1° - Description des électrophorégrammes

Des échantillons correspondant à 160 µg de protéines sont fractionnés sur un gel à 7% avec le système tampon I. La coloration est effectuée au noir amide.

Pour une meilleure exploitation des résultats, nous divisons, d'une façon peut-être arbitraire, les électrophorégrammes en trois zones de mobilités différentes : rapide, intermédiaire et lente (r, i, l).

Les électrophorégrammes sont reproduits sur la figure 47.

a) Crassostrea angulata

L'aspect électrophorétique de l'extrait du muscle complet de C. angulata fait apparaître en moyenne 21 bandes, dont 1 bande exclue qui, restant sur la zone de départ, ne subit pas le processus de filtration moléculaire.

La zone rapide comprend 9 bandes dont 6 fines très rapides et un groupe très caractéristique de 3 bandes bien colorées et moins rapides : 1 bande centrale, épaisse et très colorée, encadrée par 2 bandes plus pâles.

La zone intermédiaire présente 6 bandes dont les deux plus importantes se situent en son milieu.

La zone lente, limitée vers le bas par une bande assez fortement colorée, comprend 5 à 7 bandes très lentes, fines, tassées, dont le nombre peut varier entre 2 et 4 suivant la longueur de migration. Cette zone est limitée vers le haut par la bande exclue.

La partie transparente donne un aspect identique. Seule, manque la bande la plus rapide de la zone intermédiaire. Le groupe caractéristique des 3 bandes de la zone rapide rappelle celui observé sur acétate de cellulose.

La partie nacrée est différente de la partie transparente. Son aspect général est beaucoup plus pâle bien que la quantité de protéine déposée soit la même que pour la partie transparente ou le muscle complet. Nous dénombrons 20 bandes, y compris la bande exclue, mais leur disposition n'est pas la même. Elles sont moins prononcées et plus uniformément réparties sur toute la longueur du gel.

La zone rapide comprend 8 bandes; 5 sont très rapides et correspondent grossièrement aux 6 bandes des muscles complets et parties transparentes. Les 3 bandes moins rapides sont groupées de telle façon que la bande centrale, épaisse, trouvée dans la partie transparente et le muscle complet, n'y a pas son équivalent.

La zone intermédiaire a 6 bandes régulièrement espacées, ce qui n'est pas le cas pour le muscle complet et la partie transparente. On doit y noter la présence de la bande, absente dans la partie transparente, et présente dans le muscle complet.

La zone lente, formée de 6 bandes, offre un aspect différent de celui du muscle complet et de la partie transparente.

La résolution de la partie nacrée est ici bien meilleure que sur acétate de cellulose.

Il faut remarquer, comme en chromatographie d'exclusion-diffusion et en électrophorèse sur acétate de cellulose, que la partie transparente impose son aspect au muscle complet.

b) Crassostrea gigas

L'aspect électrophorétique du muscle complet fait apparaître 19 bandes dont 1 bande exclue.

La zone rapide comprend 8 bandes : 5 très rapides, également espacées et le groupe caractéristique des 3 bandes dont 2 sont d'égale intensité et très colorées. Nous avons noté cette même disposition sur acétate de cellulose.

La zone intermédiaire présente 5 bandes; 2 d'entre elles sont nettement plus épaisses.

La zone lente comprend 6 bandes dont la plus anodique est bien marquée.

La partie transparente comprend 16 bandes. L'aspect de la zone rapide est pratiquement le même que la zone correspondante du muscle complet. La zone intermédiaire est plus simple que celle du muscle complet; il lui manque les 2 fines bandes anodiques. Il existe donc un "vide" entre zone rapide et intermédiaire. Quand à la zone lente, elle comprend 5 bandes correspondant sensiblement à celles du muscle complet.

La partie nacrée possède 16 bandes comme la partie transparente, mais réparties de façon différente. La zone rapide comprend 8 bandes comme dans la partie transparente et le muscle complet, mais la bande centrale du groupe caractéristique des trois bandes est absente; la bande la plus lente de ce groupe n'est que faiblement représentée dans la partie nacrée.

La zone intermédiaire est formée de 4 bandes dont l'une correspond à la bande du muscle complet qui est absente dans la partie transparente.

La zone lente, de 4 bandes, contient 1 bande fortement colorée, surmontée de 2 bandes très fines.

Nous avons représenté à la figure 48 les densitométries correspondant à ces électrophorégrammes de C. gigas. Leur comparaison confirme la description que nous venons de donner.

Pour la zone rapide, la région des bandes très rapides, A, est plus marquée dans la partie nacrée que partout ailleurs. La région des 3 bandes caractéristiques, B, est très nette dans le muscle complet et la partie transparente; deux pics d'égale importance correspondent aux 2 bandes très colorées. La région B de la partie nacrée ne possède pas cet aspect.

Entre la zone rapide et la zone intermédiaire, existe dans le muscle complet un minimum très prononcé. Ceci est encore plus caractéristique dans la partie transparente où il existe un "vide" entre les deux zones.

La partie nacrée ne possède pas ce minimum. Il y a en effet une bande à ce niveau. On comprend donc pourquoi le minimum du muscle complet (partie transparente + partie nacrée) est moins prononcé que dans la partie transparente.

Pour la zone intermédiaire, on remarque un pic C qui, assez petit dans la partie nacrée, est important dans la partie transparente et donc moyen dans le muscle complet.

Dans la zone lente, un pic D prédomine; il est important dans la partie nacrée et plus faible dans la partie transparente.

c) *Ostrea edulis*

L'aspect électrophorétique du muscle complet donne 19 bandes dont 1 bande exclue.

Dans la zone rapide, on remarque 6 bandes dont la moins anodique qui limite la zone est très importante et très colorée et rappelle celle trouvée sur acétate de cellulose.

Dans la zone intermédiaire, il y a 7 bandes, dont 4 sont très fines et très régulièrement espacées.

La zone lente comprend 6 bandes dont les 4 du centre sont très fines.

La partie transparente est formée de 17 bandes. Nous retrouvons sensiblement le même aspect que pour le muscle complet. Il manque cependant 1 bande de la zone intermédiaire et l'une des fines bandes de la zone lente. Il existe donc, comme pour les *Crassostrea*, un "vide" entre les zones rapide et intermédiaire.

La partie nacrée, qui n'est formée que de 14 bandes, ne possède pas dans la zone rapide la bande très importante et très colorée si caractéristique du muscle complet et de la partie transparente.

La zone intermédiaire, assez dépouillée, comprend 1 bande anodique, nette, qui n'a pas d'équivalent dans la partie transparente, mais qui se retrouve dans le muscle total.

La zone lente est identique à celle du muscle transparent; cependant, la bande anodique est plus importante.

Les nombres de bandes des différentes zones sont repris au tableau XXXIV. Ce tableau ne rend compte ni de l'importance des bandes, ni de leur disposition relative.

T A B L E A U XXXIV

Nombres de bandes relevés sur les électrophorégrammes de la figure 47

	C. angulata			C. gigas			O. edulis		
	M.C.	P.T.	P.N.	M.C.	P.T.	P.N.	M.C.	P.T.	P.N.
l	6	6	6	6	5	4	6	5	5
i	6	5	6	5	3	4	7	6	4
r 3	3)	3)	3)	3)	3)	3)	1)	1)	1)
r très rapides	)9	)9	)8	)8	)8	)8	)6	)6	)5
	6)	6)	5)	5)	5)	5)	5)	5)	4)
Somme	21	20	20	19	16	16	19	17	14

2° - Comparaison entre les espèces

Nous avons comparé les densitométries des muscles complets, des parties transparentes et des parties nacrées des 3 espèces d'huîtres étudiées. Les tableaux des R_r de bandes pour les parties transparentes et des pourcentages des surfaces de zones pour les muscles complets seront présentés ensuite.

a) Comparaison des densitométries

Les aspects densitométriques sont très significatifs. Nous ne nous attacherons donc qu'à certains points particuliers.

- Muscles complets (figure 49)

Les zones rapides sont surtout caractérisées par la région B formée de 3 pics chez les Crassostrea et de 1 pic chez O. edulis. Il faut noter que les 3 pics de C. angulata n'ont pas le même aspect quantitatif chez C. gigas.

Les zones intermédiaires des Crassostrea se ressemblent; elles comportent un grand pic C que l'on retrouve beaucoup moins marqué chez O.edulis.

Les zones lentes des 3 espèces montrent une certaine similitude.

- Parties transparentes (figure 50)

Les profils ressemblent à ceux des muscles complets. Les maxima et minima sont mieux marqués, car le profil de la nacrée n'interfère pas ici. Les régions B des Crassostrea et d'O. edulis rappellent les tracés obtenus sur acétate de cellulose.

- Parties nacrées (figure 51)

Les profils diffèrent totalement de ceux des parties transparentes essentiellement à cause de la région B où l'on note l'absence des pics caractéristiques. Entre les zones rapide et intermédiaire, il n'y a pas le minimum visible dans les parties transparentes, car à ce niveau existe une bande sur l'électrophorégramme.

b) Rr et pourcentages

Les R_r des diverses bandes pour les parties transparentes sont repris aux tableaux XXXV, XXXVI et XXXVII; les pourcentages des muscles complets

figurent au tableau XXXVIII. Comme pour la chromatographie d'exclusion - diffusion, nous avons fait figurer : le nombre de mesures, la moyenne, l'erreur-type, les limites de confiance de la moyenne pour un coefficient de confiance de 95 %, enfin le pourcentage d'imprécision.

3° - Etude de quelques cas particuliers

a) Emploi du gel à 11% et de la coloration au coomassie

Nous avons déjà exposé l'intérêt du gel à 11 % d'acrylamide et de la coloration par le coomassie pour une meilleure étude des bandes rapides.

La figure 52 présente les électrophorégrammes des muscles complets des 3 espèces. Les zones rapides sont particulièrement nettes, mais au détriment des zones intermédiaires et lentes. On peut noter que les différences, en ce qui concerne les bandes très rapides, s'accentuent entre *C. angulata* et *C. gigas*. Chez *O. edulis*, l'aspect électrophorétique se complique par rapport au gel à 7 %.

b) Myogène et globuline X

Nous avons représenté sur la figure 53 les électrophorégrammes du muscle complet, du myogène et de la globuline X d'*O. edulis* et, sur la figure 54, les densitométries correspondantes pour *C. angulata*.

Dans les deux espèces, les bandes caractéristiques les plus prononcées de la zone rapide sont absentes dans la globuline X. La zone lente très chargée pour la globuline X ne comporte plus que 2 bandes dans le myogène où l'on note la disparition presque complète de la bande exclue.

c) Extraits obtenus à l'aide de tampons de forces ioniques plus élevées.

Des extraits de la partie transparente et de la partie nacrée de l'adducteur d'*O. edulis* obtenus à l'aide d'un tampon phosphate-KCl de force

ionique 0,15 (pH 7,5), ont été soumis à l'électrophorèse. Les aspects ne diffèrent en rien de ceux que nous avons précédemment décrits pour une force ionique de 0,05.

Les extraits de forces ioniques plus élevées (0,25; 0,35) donnent des électrophorégrammes dont les bandes sont moins nombreuses et plus floues. Ceci est dû à l'apparition, dans ces extraits, de protéines de structure en quantité notable, ce qui abaisse la concentration relative des protéines sarcoplasmiques. Quant aux protéines de structure, elles semblent exclues des gels à 7 %.

d) Incidence du mode de conservation des extraits

Des extraits conservés au congélateur donnent parfois des électrophorégrammes prenant mieux le colorant (noir amide) que des électrophorégrammes obtenus à partir d'extraits lyophilisés. On ne peut en déduire que les protéines se soient dénaturées à la lyophilisation, car la capacité de réaction protéine-colorant peut aussi bien diminuer qu'augmenter avec la dénaturation. Nous citerons l'exemple du myogène A dont la réaction avec le bleu de bromothymol s'intensifie à la dénaturation. La réaction myosine-bleu de méthylène diminue avec la dénaturation à la chaleur (116).

e) Considérations générales

En gel de polyacrylamide, nous avons obtenu une meilleure résolution, doublant le nombre de fractions par rapport à l'acétate de cellulose gélatineux.

Les muscles complets et les parties transparentes donnent de bons résultats avec un gel à 7 %. Si nous comparons les deux techniques, on obtient dans l'une et l'autre un groupe de 3 bandes caractéristiques pour les *Crassostrea* et une bande intense chez *O. edulis*.

Avec la méthode en gel de polyacrylamide, nous décelons de petites différences entre *C. angulata* et *C. gigas*. Ceci apparaît mieux lorsque l'on emploie un gel à 11 % coloré au coomassie, pour préciser la zone rapide.

Contrairement à ce que nous avions sur acétate de cellulose, nous avons sur gel de polyacrylamide un fractionnement convenable des parties nacrées. Les diagrammes sont d'ailleurs assez différents d'une huître à l'autre.

Myogène et globuline X se répartissent différemment sur les électrophorégrammes.

Par contre, l'électrophorèse en colonne de gel de polyacrylamide ne permet pas, en une même migration, de déceler les bandes anodiques et celles qui éventuellement migreraient vers la cathode.

La méthode préparative, que nous avons commencé à expérimenter, doit nous permettre d'isoler un grand nombre de ces fractions.

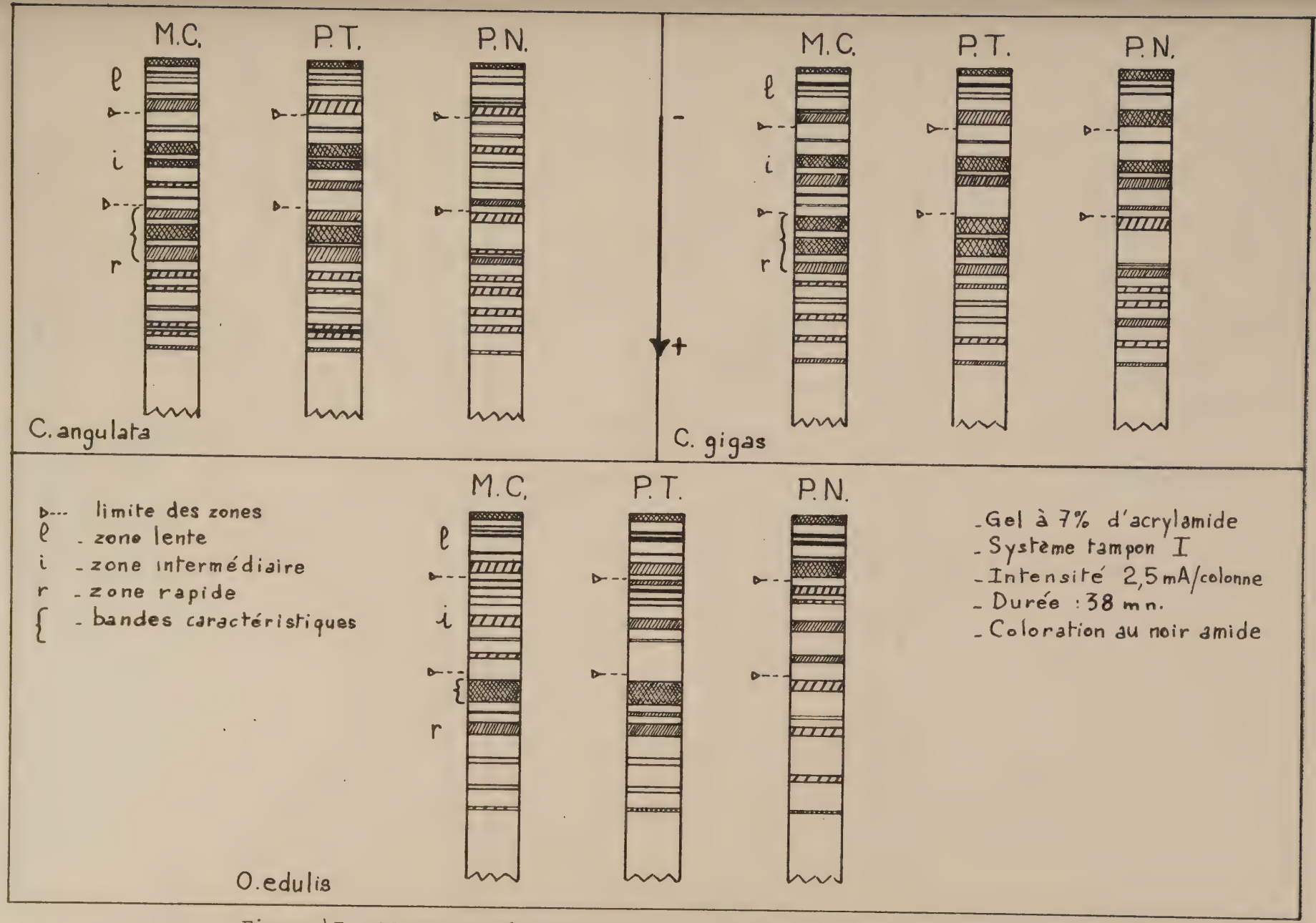


Figure 47.- Electrophorégrammes des divers extraits en gel de polyacrylamide.

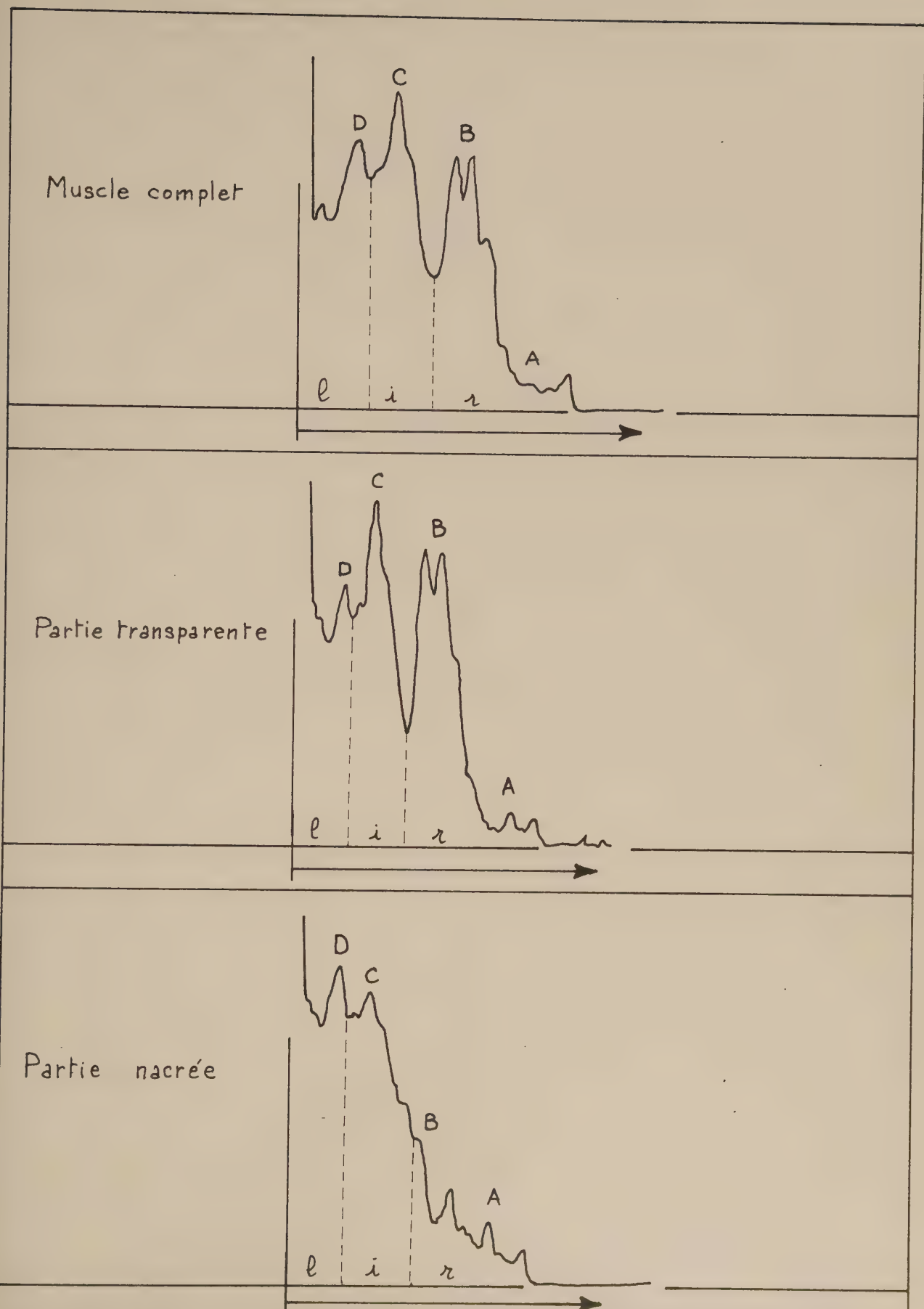


Figure 48.- Densitométries des électrophorégrammes en gel de polyacrylamide représentés sur la figure 47 (C. gigas)

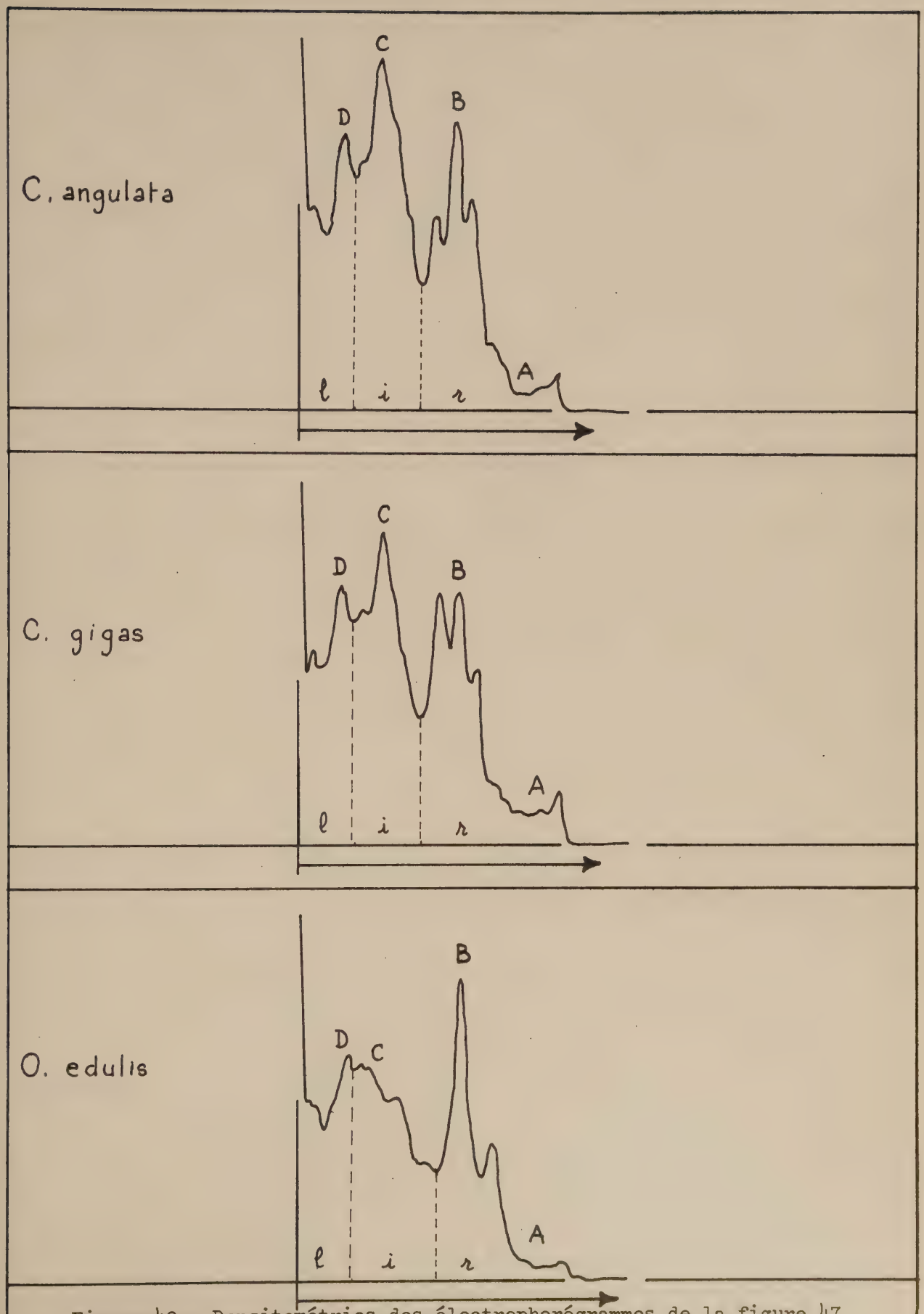


Figure 49.- Densitométries des électrophorégrammes de la figure 47 (muscles complets)

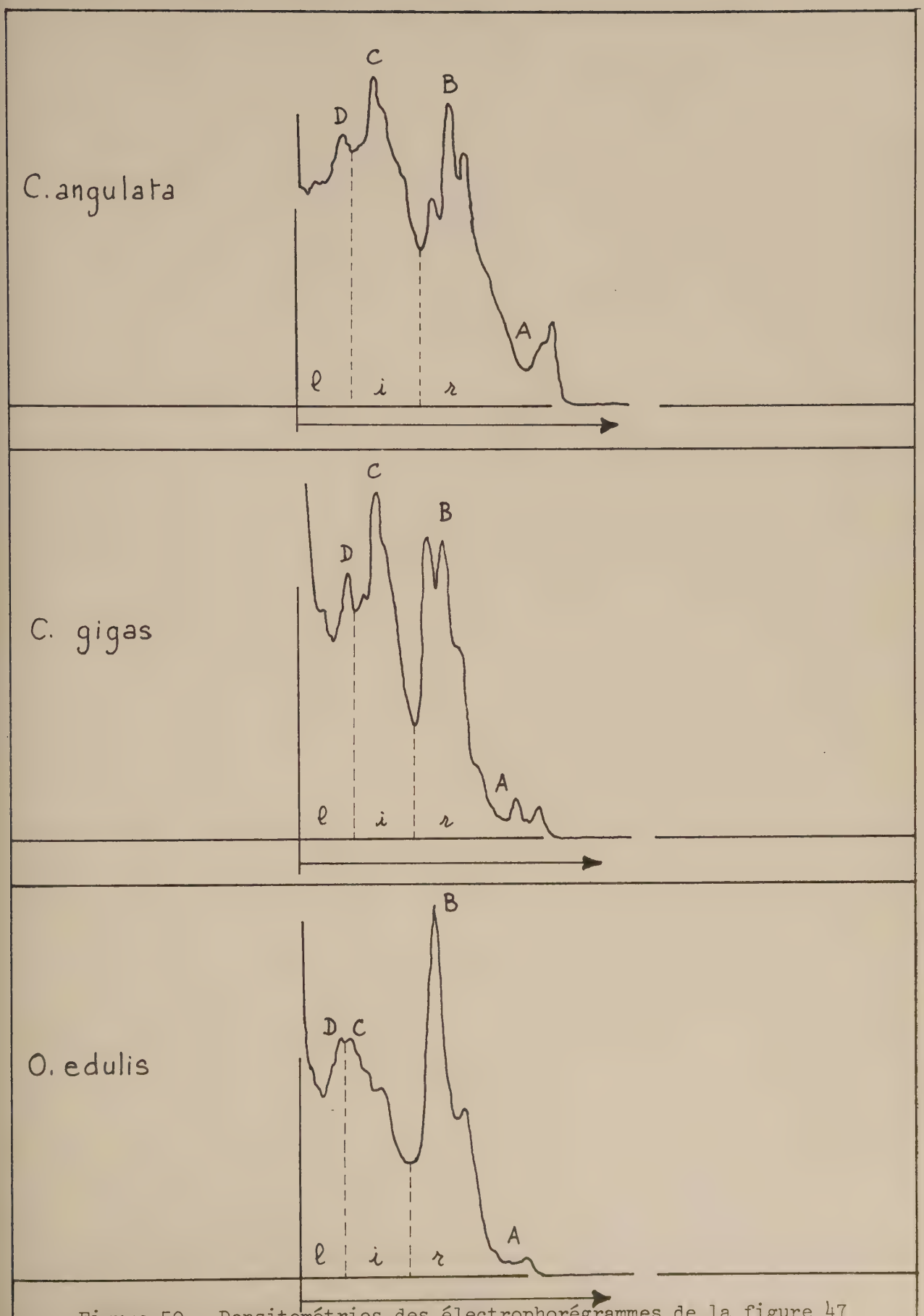


Figure 50.- Densitométries des électrophorégrammes de la figure 47 (parties transparentes)

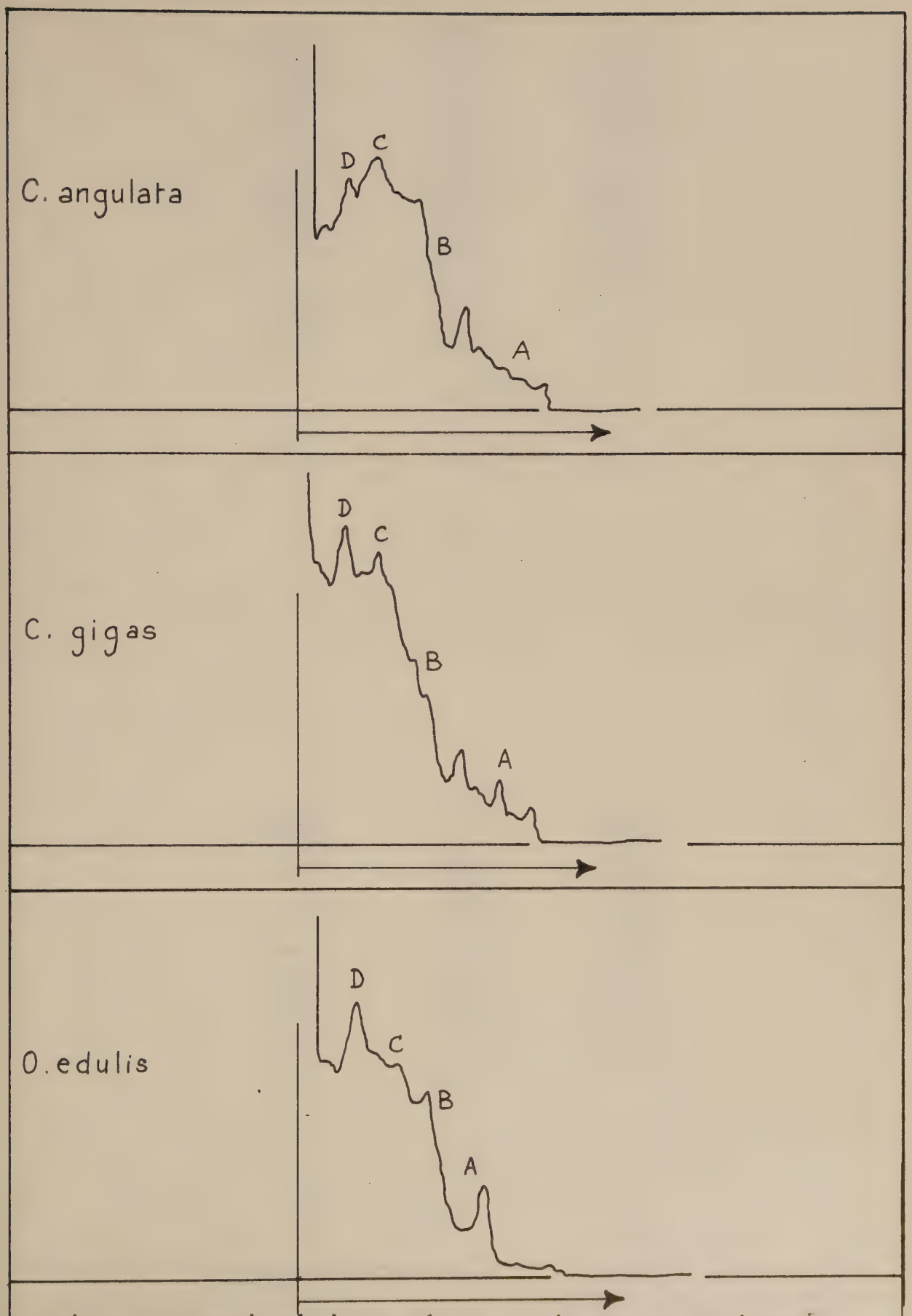


Figure 51.- Densitométries des électrophorégrammes de la figure 47 (parties nacrées)

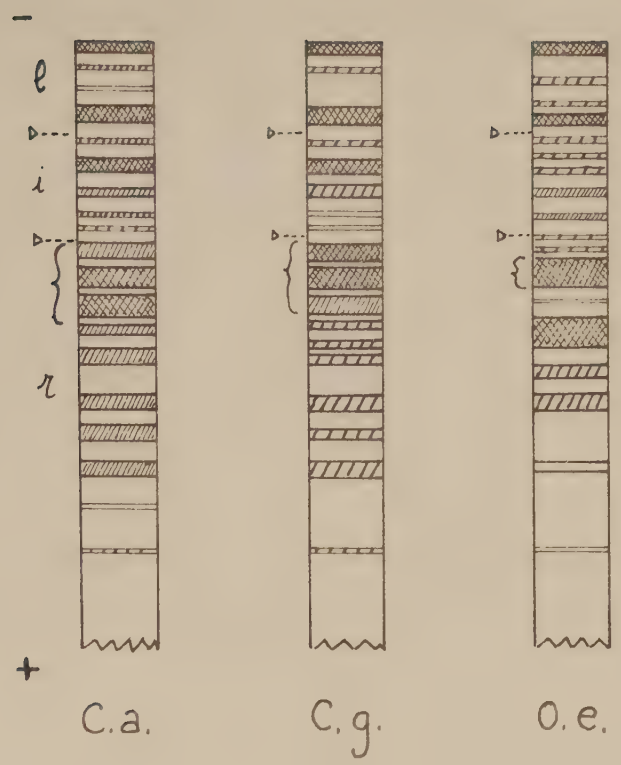


Figure 52.- Electrophorégrammes des extraits de muscle complet des trois espèces d'huîtres. Gel à 11 % d'acrylamide; Système tampon I; intensité 2,5 mA/colonne; durée 38mn; coloration au coomassie.

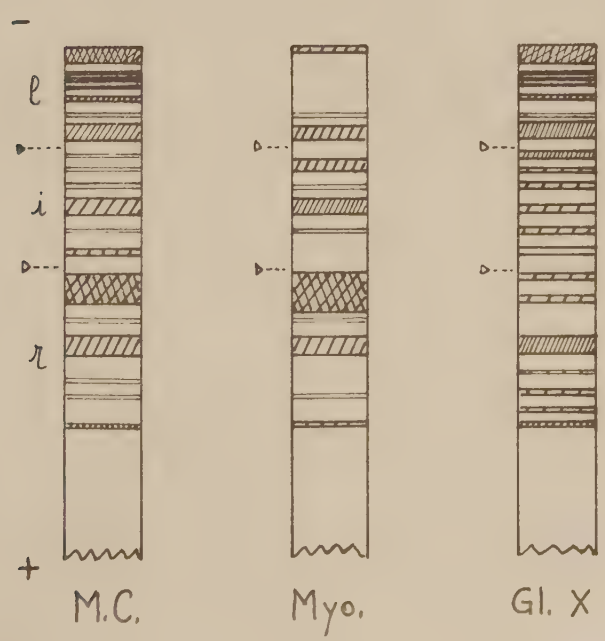


Figure 53.- Electrophorégrammes des extraits du muscle complet (M.C.) du myogène (Myo.) et de la globuline X (Gl.X) d'O. edulis. Gel à 7 %; Système tampon I; intensité 2,5 mA/colonne; durée 39 mn; coloration au noir amide.

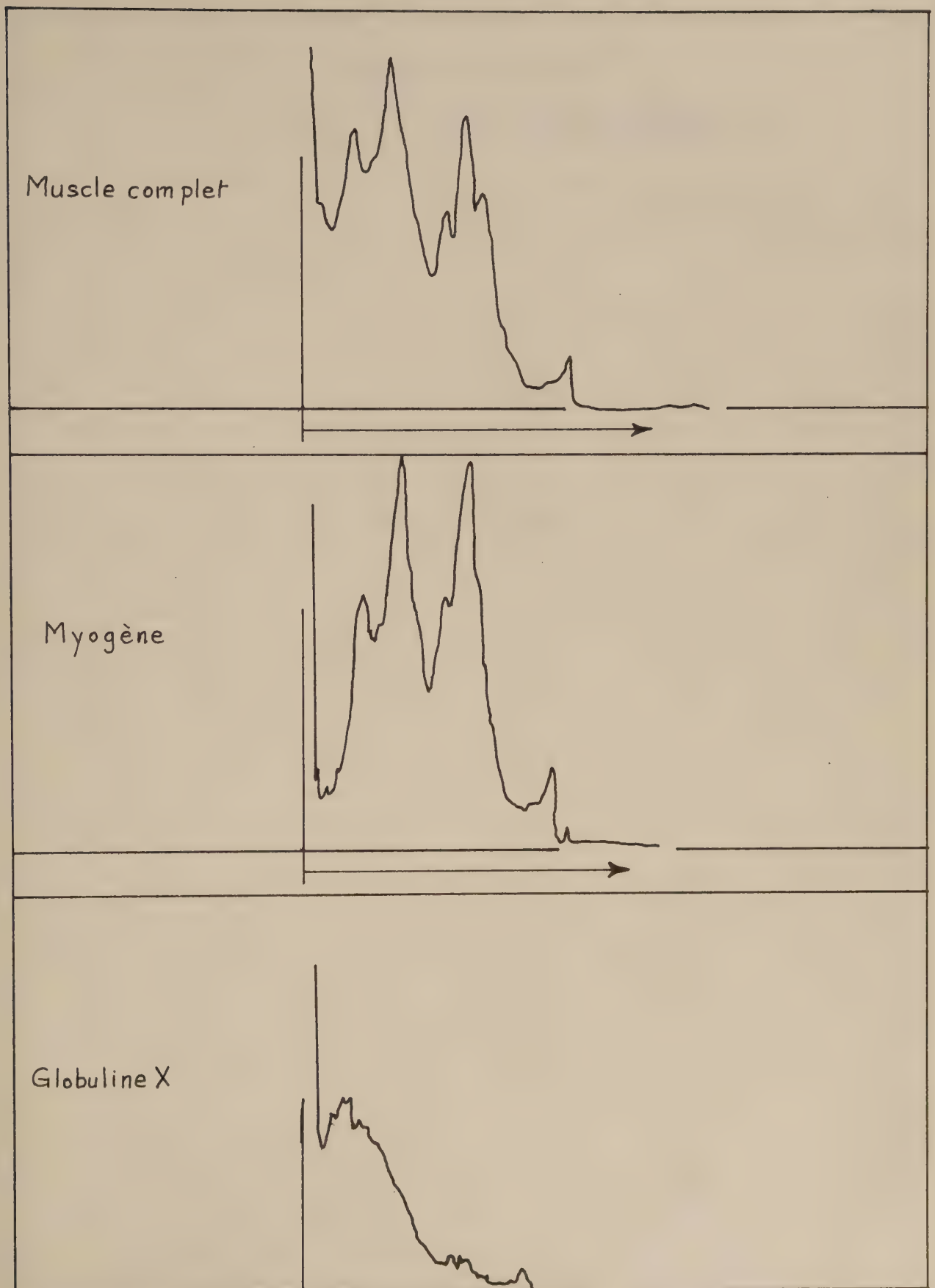


Figure 54.-Densitométries des électrophorégrammes du Muscle complet, myogène et globuline X de C.angulata (conditions identiques à celles de la figure 53)

TABLEAU XXXV

Etude statistique des R_f Crassostrea angulata P.T.
(Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 7 %)

zones	bandes	$\bar{x}$	s_m	$\bar{x} - t s_m$	$\bar{x} + t s_m$	$\frac{t s_m}{\bar{x}} \times 100$
	n=3	0,072				
l	n=6	0,084	0,007	0,066	0,102	21,12 %
	n=6	0,102	0,006	0,086	0,119	16,06 %
	n=4	0,143				
	n=6	0,182	0,008	0,160	0,203	11,67 %
i	n=6	0,248	0,008	0,226	0,270	8,86 %
	n=6	0,315	0,006	0,301	0,330	4,68 %
	n=6	0,364	0,007	0,347	0,381	4,68 %
	n=6	0,437	0,005	0,423	0,451	3,11 %
r	n=6	0,534	0,007	0,516	0,552	2,40 %
	n=6	0,601	0,008	0,581	0,620	3,26 %
	n=6	0,674	0,006	0,658	0,691	2,47 %
	n=6	0,738	0,007	0,720	0,756	2,39 %
	n=6	0,799	0,009	0,776	0,822	2,88 %
	n=5	0,856	0,004	0,845	0,867	1,29 %
	n=6	0,930	0,003	0,921	0,937	0,87 %
		bande de référence -				

TABLEAU XXXVI

Etude statistique des R_r C. gigas P. T.
(Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 7%)

Zones	bandes	$\bar{x}$	s_m	$\bar{x} - t s_m$	$\bar{x} + t s_m$	$\frac{t s_m}{\bar{x}} \times 100$.
l	n=7	0,072	0,003	0,064	0,080	11,22 %.
	n=7	0,102	0,005	0,091	0,114	11,22 %.
	n=7	0,179	0,004	0,171	0,188	4,91%
i	n=7	0,247	0,002	0,242	0,252	1,98 %
	n=7	0,319	0,002	0,313	0,325	1,87 %
	n=7	0,388	0,003	0,380	0,396	2,09 %
r	n=7	0,533	0,003	0,526	0,540	1,3 %
	n=7	0,604	0,003	0,597	0,612	1,21%
	n=7	0,673	0,004	0,664	0,683	1,41%
	n=7	0,738	0,003	0,731	0,745	0,94%
	n=7	0,784	0,004	0,773	0,795	1,43%
	n=7	0,855	0,003	0,848	0,862	0,81%
	n=7	0,919	0,002	0,913	0,925	0,65%
		bande de référence.				

TABLEAU XXXVII

Etude statistique des R_r O. edulis P. T.
(Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 7%)

zones	bandes	$\bar{x}$	s_m	$\bar{x} - t s_m$	$\bar{x} + t s_m$	$\frac{t s_m}{\bar{x}} \times 100$
l	n=10	0,082	0,003	0,076	0,088	7,78 %
	n=10	0,108	0,003	0,102	0,114	5,51 %
	n=10	0,154	0,004	0,146	0,162	5,28 %
	n=10	0,199	0,004	0,190	0,208	4,40 %
i	n=7	0,240	0,006	0,225	0,254	6,04 %
	n=5	0,283	0,006	0,267	0,299	5,64 %
	n=10	0,315	0,004	0,305	0,325	3,13 %
	n=3	0,327				
	n=10	0,385	0,006	0,371	0,399	2,57 %
	n=10	0,437	0,004	0,429	0,447	2 %
r	n=10	0,616	0,005	0,604	0,628	1,91 %
	n=10	0,682	0,005	0,669	0,694	1,82 %
	n=10	0,742	0,006	0,728	0,757	1,95 %
	n=10	0,847	0,005	0,834	0,859	1,46 %
	n=10	0,926	0,003	0,920	0,933	0,69 %
		bande de référence.				

TABLEAU XXXVIII

Etude statistique des pourcentages des zones.
Electrophorèse des muscles complets sur gel de polyacrylamide à 7%.

CRASSOSTREA ANGULATA

n = 10

		$\bar{x}$	s_m	$\bar{x} - t s_m$	$\bar{x} + t s_m$	$\frac{t s_m}{\bar{x}} \times 100$
zone lente		22,90	0,51	21,75	24,05	5,03%
zone intermédiaire		31,52	0,58	30,21	32,83	4,15%
zone rapide	3 bandes	25,24	0,68	23,71	26,77	6,07%
	très rapides	8,90	0,78	7,14	10,66	19,73%
	total	34,14	0,29	33,48	34,81	1,95%

CRASSOSTREA GIGAS

n = 7

		$\bar{x}$	s_m	$\bar{x} - t s_m$	$\bar{x} + t s_m$	$\frac{t s_m}{\bar{x}} \times 100$
zone lente		23,57	0,43	22,52	24,62	4,44%
zone intermédiaire		31,58	0,51	30,33	32,83	3,96%
zone rapide	3 bandes	27,93	0,31	27,17	28,69	2,71%
	très rapides	6,51	0,11	6,26	6,77	3,98%
	total	34,44	0,34	33,61	35,28	2,42%

OSTREA EDULIS

n = 7

		$\bar{x}$	s_m	$\bar{x} - t s_m$	$\bar{x} + t s_m$	$\frac{t s_m}{\bar{x}} \times 100$
zone lente		26,20	1,30	23,01	29,39	12,17%
zone intermédiaire		27,33	1,19	24,40	30,25	10,68%
zone rapide	bande caractérist.	20,62	0,90	18,42	22,82	10,67%
	très rapides	12,16	1,22	9,16	15,16	24,65%
	total	32,78	0,59	31,24	34,23	4,40%

IV - ESSAIS D'EMPLOI COMBINE DES METHODES

Nous avons essayé de combiner les méthodes précédentes pour préciser si possible les résultats.

D'une part, nous avons analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide certaines fractions provenant d'électrophorégrammes préparatifs sur blocs d'acétate de cellulose gélatineux.

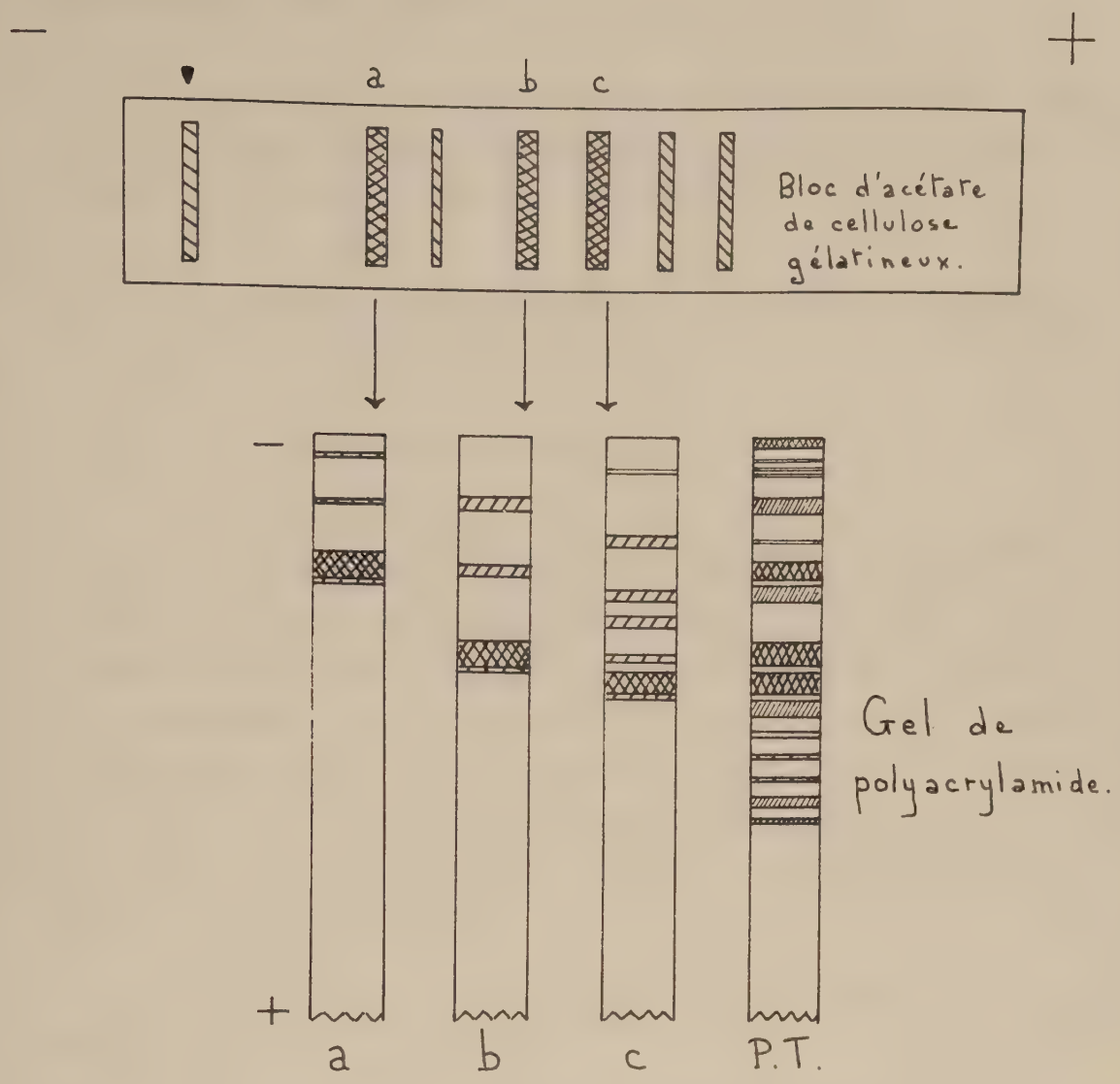
D'autre part, nous avons soumis à l'électrophorèse sur acétate de cellulose et sur colonnes de gel de polyacrylamide, les "pics" isolés par chromatographie d'exclusion-diffusion sur colonnes de Sephadex.

1° - Electrophorèse préparative sur acétate de cellulose et électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide.

Un extrait de partie transparente de muscle adducteur de C. gigas séparé sur bloc d'acétate de cellulose fournit plusieurs fractions qui sont récupérées selon la technique déjà décrite.

Les fractions a, b et c sont soumises à l'électrophorèse en colonnes de gel de polyacrylamide à 7 %. La figure 55 rend compte des résultats obtenus.

Les bandes a, b et c ont chacune une mobilité électrophorétique donnée, énoncée ici dans un ordre croissant. Dans chaque tube de gel, on retrouve une bande importante, et l'ordre des mobilités semble respecté. Mais, au phénomène électrophorétique se superpose une "filtration" moléculaire : à mobilités électrophorétiques égales, les plus grosses molécules sont retardées. On remarque dans chaque tube de gel quelques bandes moins



Bloc d'acétate de cellulose.

tampon : Tris-glycine pH 8,5

V/cm : 16,5.

durée : 3h30.

Gel de polyacrylamide à 7%.

tampon : système-tampon I.

intensité : 2,5 mA / colonne.

durée : 39 mn.

coloration : coomassie.

Figure 55.- Electrophorèse préparative sur acétate de cellulose et Electrophorèse analytique en gel de polyacrylamide. Extrait de la partie transparente de l'adducteur de C. gigas

intenses migrant plus lentement que la bande importante.

On voit, par exemple, que les protéines constituant la bande c, qui ont même mobilité électrophorétique, ont des tailles variables, ce qui correspond à des poids moléculaires différents.

2° - Chromatographie préparative sur colonne de Sephadex et électrophorèses analytiques.

a) sur acétate de cellulose

Un extrait de partie transparente d'adducteur de C. angulata est chromatographié sur colonne de Sephadex G-100 selon la technique habituelle. Les contenus des tubes correspondants aux sommets des pics Ib, II et III sont lyophilisés et repris par un volume d'eau distillée représentant le 1/4 ou le 1/5 du volume initial. Des échantillons de 8 µl de ces solutions concentrées, correspondant à 50 µg de protéines sont soumis à l'électrophorèse sur acétate de cellulose. Les électrophorégrammes sont représentés à la figure 56a qui permet de les comparer avec une électrophorèse d'un extrait entier de partie transparente.

Le pic Ib donne une traînée uniformément colorée, sans bandes marquées.

Le pic II se fractionne en plusieurs bandes : 1 bande sur la zone de départ, 3 bandes lentes et des traces au niveau du groupe des trois bandes caractéristiques.

Le pic III ne comprend pas les bandes lentes que nous venons de décrire, mais le groupe des 3 bandes caractéristiques bien marqué, ainsi que quatre bandes plus rapides.

Sur les électrophorégrammes des pics II et III, les bandes sont bien séparées et le fond coloré n'existe plus.

b) sur gel de polyacrylamide

Les contenus des tubes correspondant aux pics II et III de l'éluat d'un extrait de partie transparente de C. angulata passé sur colonne de Sephadex G-75 sont lyophilisés et respectivement repris au 1/4 et au 1/2 avec de l'eau distillée. Des échantillons de 35 µl sont déposés sur des colonnes de gel de polyacrylamide et soumis à l'électrophorèse (figure 56b).

Le pic II donne les bandes importantes de la zone intermédiaire précisée antérieurement; les zones rapide et lente ne sont représentées ici que sous forme de traces.

Pour le pic III, on obtient essentiellement le groupe des 3 bandes caractéristiques ainsi que les autres éléments de la zone rapide. Par contre la zone intermédiaire est peu marquée, la zone lente ne fournit qu'une faible bande et la partie cathodique du gel ne présente aucune bande.

En superposant les électrophorégrammes des pics II et III, on retrouve toutes les bandes des électrophorégrammes de la partie transparente. Le pic I que nous n'avons pas analysé correspondrait alors à la bande exclue et au fond bleu, rencontré normalement sur nos électrophorégrammes, qui est absent ici.

En examinant les électrophorégrammes obtenus sur acétate de cellulose et sur gel de polyacrylamide, on peut relever des analogies et des différences.

Dans les deux cas, le pic II est surtout constitué par les bandes qui migrent lentement à l'électrophorèse, et le pic III comporte les bandes rapides. Donc, les molécules de faibles poids moléculaires sont les plus rapides tant sur acétate de cellulose qu'en colonne de gel de polyacrylamide.

Les différences entre les résultats donnés par l'acétate de cellulose et le gel de polyacrylamide proviennent de l'hétérogénéité moléculaire des fractions étudiées. En effet, le contenu d'un tube d'éluat ne contient

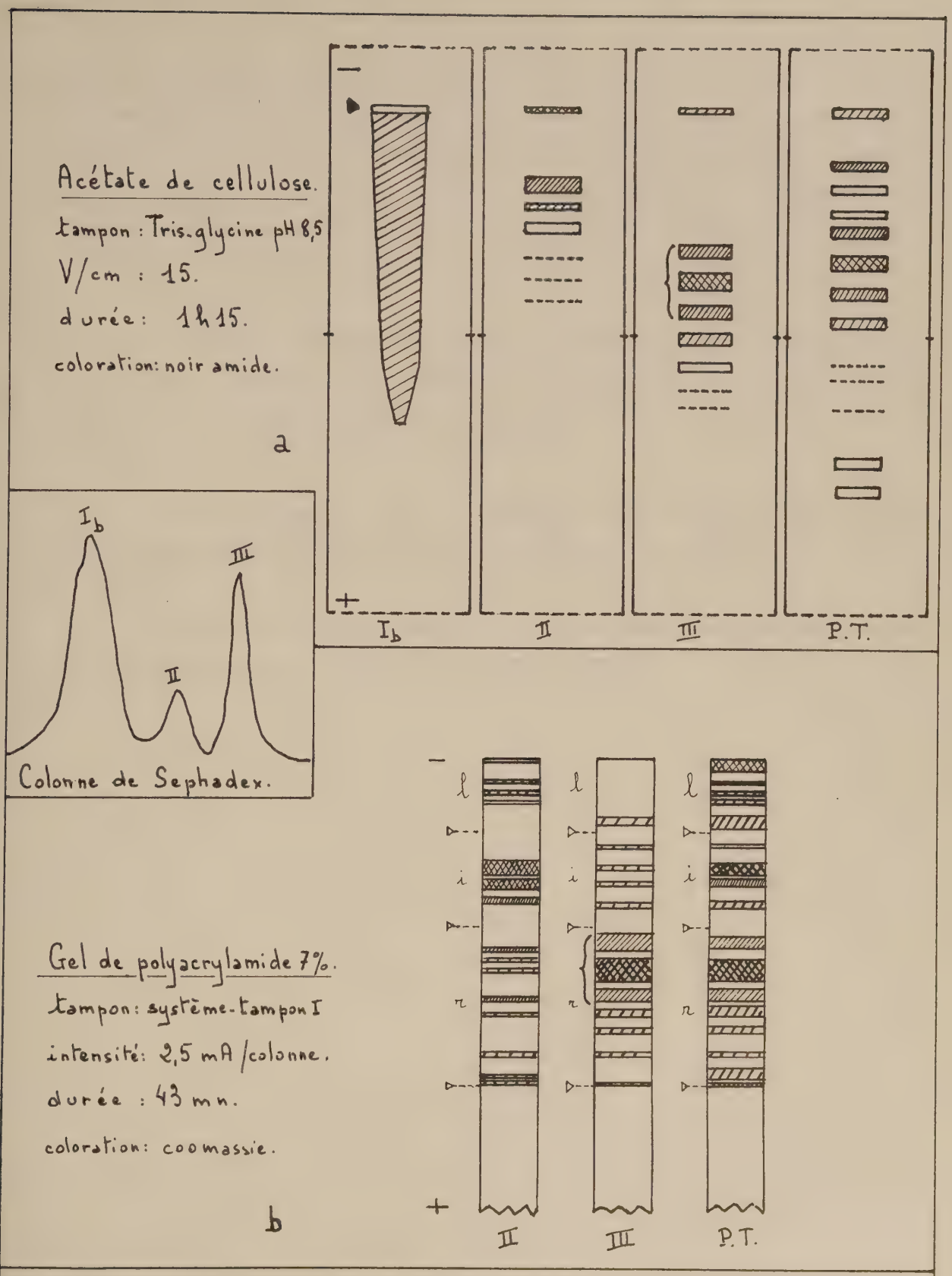


Figure 56.- Chromatographie préparative sur colonne de Sephadex et électrophorèses analytiques. Extrait de la partie transparente de l'adducteur de C. angulata.

pas des protéines d'un poids moléculaire donné, mais de poids moléculaires différents et voisins, comme nous l'avons déjà fait remarquer. Sur acétate de cellulose, la mobilité électrophorétique est seule en cause, tandis que en gel de polyacrylamide, un nouveau paramètre apparaît : la filtration moléculaire. Ainsi le pic III comporte 8 bandes sur acétate et 12 bandes sur gel de polyacrylamide; la différence provient de la filtration moléculaire.

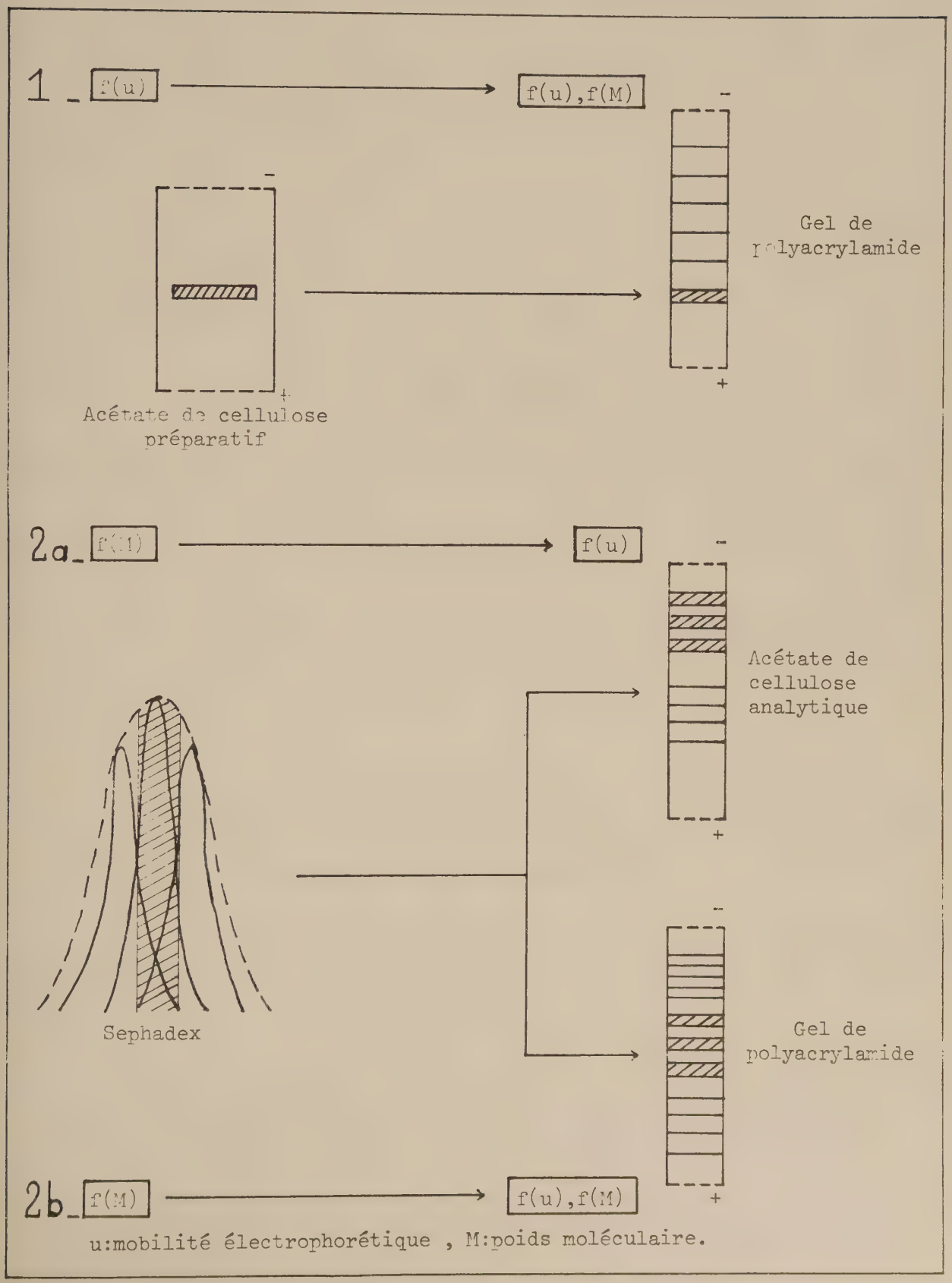
Certaines interprétations peuvent paraître discutables. Ainsi, lorsque nous parlons de "même mobilité électrophorétique" pour une bande séparée sur acétate, nous entendons que cela n'est rigoureux que pour une épaisseur infiniment petite de cette bande.

Nous retiendrons que la combinaison des méthodes essayées peut amener rapidement à la purification des diverses fractions.

Le tableau XXXIX schématise tous les résultats fournis par les combinaisons de méthodes que nous venons d'exposer.

TABLEAU XXXIX

Schéma de l'emploi combiné des méthodes.



u:mobilité électrophorétique , M:poids moléculaire.

SIXIEME PARTIE

ESSAIS D'INTERPRETATION BIOLOGIQUE DES RESULTATS

Des analogies et des différences entre les chromatogrammes et les électrophorégrammes des extraits musculaires des huîtres étudiées ont été signalées dans les commentaires de nos résultats.

Les différences physiologiques existant entre la partie nacrée et la partie transparente du muscle adducteur des huîtres ne semblent pas uniquement reposer au niveau des protéines de structure.

A chaque type de tissu musculaire correspondent des protéines solubles différentes. Aussi il nous a semblé intéressant de comparer ces protéines à celles des muscles squelettiques d'un vertébré aquatique : la carpe.

Nous terminerons notre thèse en groupant quelques-uns de nos résultats dans le sens d'une taxonomie biochimique des Ostreidae.

I - COMPARAISON DES PROTEINES DU MUSCLE ADDUCTEUR DE L'HUITRE ET DES MUSCLES SQUELETTIQUES DE LA CARPE.

Nous avons comparé les protéines solubles décelées dans les extraits d'huîtres que nous avons préparés, aux protéines isolées des tissus de divers invertébrés et surtout des muscles de poissons.

Les protéines musculaires, et plus particulièrement celles de faibles poids moléculaires, présentes dans certains myogènes retiennent, depuis quinze ans, l'attention d'un groupe de chercheurs Belges.

Nous avons déjà fait une analyse complète (154) de ces travaux que nous pouvons résumer en quatre étapes.

1 - Les travaux de base, de 1953 à 1962, s'appliquent aux myogènes de poissons : carpe, plie: HAMOIR (74)(75)(76)(77)(78), HENROTTE (88)(89), JEBSEN et HAMOIR (111)(112).

2 - Les importantes mises au point de 1964 et 1965, sur les myogènes de la carpe : PECHERE, HAMOIR, KONOSU et FOCANT (178), HAMOIR et KONOSU (79), KONOSU, HAMOIR et PECHERE (129), PECHERE et FOCANT (179).

3 - Les travaux comparatifs de FOCANT et PECHERE (1965) (58) sur divers invertébrés et vertébrés inférieurs; ceux de PIRONT, HAMOIR et CROKAERT (183)(184) sur Tilapia macrochir en 1966 et 1968.

4 - Une publication de PECHERE (177), en 1968, qui élargit le sens de tous les travaux précédents en leur donnant une grande portée phylogénétique dans la direction des protéines homologues.

1° Les protéines de faibles poids moléculaires de certains myogènes

Dès 1934, DEUTICKE (40) étudiant des extraits musculaires totaux de lapin et de grenouille par ultracentrifugation avait mis en évidence deux constituants principaux dont les constantes de sédimentation étaient les suivantes :

Lapin	5,4 S	7,7 S
Grenouille	1,1 S	7,6 S

En 1954, HAMOIR observe, par ultracentrifugation, trois constituants dans le myogène du muscle blanc de la carpe. L'un d'eux, dont il note d'ailleurs l'hétérogénéité électrophorétique, possède une très faible constante de sédimentation : 1,5 S. On pouvait donc penser que les muscles de certains vertébrés inférieurs contenaient des protéines de faibles poids moléculaires, absentes chez les vertébrés supérieurs.

Toute une suite de travaux ultérieurs, effectués à l'aide de techniques variées, confirment la présence, dans les myogènes de divers poissons, de trois fractions de constantes de sédimentation :

1,3 - 1,5 S	4,5 - 5,0 S	6,5 - 7,2 S

La fraction 1,3 - 1,5 S, de poids moléculaire peu élevé est hétérogène à l'électrophorèse et très acide; elle possède une zone de relargage très élevée; son contenu en phénylalanine est important; elle ne contient ni tyrosine ni tryptophanne.

Ces résultats ont été précisés en 1964 - 1965 pour le muscle de la carpe, par HAMOIR et ses collaborateurs qui ont souligné les différences histologiques, physiologiques et biochimiques qui existent entre les muscles blancs et rouges des poissons.

Les diagrammes électrophorétiques des deux types de muscle sont remarquablement différents bien que les résultats de l'ultracentrifugation soient semblables. La fraction de faible constante de sédimentation est isolée par le sulfate d'ammonium en profitant de sa zone élevée de relargage. Pour le muscle blanc, cette fraction est composée principalement des gradients électrophorétiques 2, 3 et 5 (figure 57a). Pour le muscle rouge, ces trois constituants sont absents.

Après une étude plus poussée des gradients 2, 3 et 5, les analogies qui existent entre eux sont ainsi précisées :

- faibles poids moléculaires : 9.000 - 13.000,

- zone de relargage élevée au sulfate d'ammonium : 70 à 100 % de saturation,

- composition mal équilibrée en acides aminés :

Phénylalanine	=	12,5 ± 1 % (p/p)
Tryptophanne	=	0
Methionine	=	0
Tyrosine) Cystéine) Proline) Arginine) Histidine)	=	0 ou au plus 1 seul résidu par molécule.

- caractère très acide.

Les mêmes auteurs ont fait usage du Sephadex G-75 pour isoler en bloc les protéines de faibles poids moléculaires du myogène et examiner ensuite leur participation éventuelle à la glycolyse anaérobie. Le passage sur Sephadex fractionne le myogène en deux pics, dont l'un est retardé.

Pour le muscle blanc, le pic retardé représente (au biuret) 28 % des protéines totales, son absorption spécifique à 254 mμ est plus faible que celle du pic non retardé, il contient 2 % de myoglobine et 26 % de protéines de faibles poids moléculaires. Son diagramme électrophorétique correspond aux pics 1, 2, 3 et 5.

Pour le muscle rouge, le pic retardé représente 25 % des protéines totales, il contient 24 % de myoglobine, 1 % de protéines de faibles poids moléculaires. Son diagramme électrophorétique correspond aux pics 1, 6 et 7.

Des expériences de glycogénolyse in vitro montrent que la fraction de faible poids moléculaire du myogène de muscle blanc de carpe ne contient pas d'enzymes de la chaine de Embden-Meyerhof.

Les myogènes de divers invertébrés et vertébrés ont ensuite été examinés en chromatographie d'exclusion-diffusion et en ultracentrifugation par FOCANT et PECHERE.

Sur les profils d'élution sur colonne de Sephadex des myogènes d'un annélide, d'un arthropode et d'un mollusque (Ampullariides), on observe un étalement correspondant aux petites molécules de la carpe plutôt qu'un pic net. Ni la chromatographie d'exclusion-diffusion, ni l'ultracentrifugation ne permettent de déceler sans ambiguité, chez ces animaux, des fractions protéiques de faibles poids moléculaires semblables à celles de la carpe. On retrouve plutôt une certaine hétérogénéité dans la distribution de la taille des molécules.

Quant aux myogènes des vertébrés, ils comportent des petites molécules chez les Cyclostomes, les Poissons et les Batraciens. A partir des Reptiles, on n'en trouve plus.

L'examen des résultats et diverses expériences semblent mettre en évidence une certaine influence du passage de la vie aquatique à la vie terrestre : le myogène des muscles blancs des Poissons est plus riche en petites molécules que celui des Batraciens et, parmi ceux-ci, les espèces les plus aquatiques en sont les mieux pourvues. Ces petites molécules ne semblent jouer aucun rôle dans la régulation de la pression osmotique. Par contre, elles pourraient jouer le rôle de réserves nutritives, car elles diminuent avec la privation de nourriture. Il faut aussi signaler que le myogène du jeune animal en est plus riche. Enfin, ces protéines spéciales de faible poids moléculaire, riches en phénylalanine, de caractère acide, pourraient

jouer un rôle de contrôle de la glycogénolyse et intervenir dans les transports actifs.

En 1968, PECHERE établit, par l'analyse et le calcul, que les trois principaux constituants de faibles poids moléculaires du myogène du muscle blanc de carpe sont très semblables quant à leur taille et leur forme.

En outre, l'étude de la constitution en acides aminés et la teneur élevée en phénylalanine des fractions protéiques de faibles poids moléculaires de la carpe et de la grenouille permet de déduire qu'elles possèdent toutes une similitude tridimensionelle.

Ces résultats suggèrent que le myogène des vertébrés inférieurs est la source d'une nouvelle classe de protéines homologues que l'auteur appelle "Parvalbumines".

Ces parvalbumines pourraient se retrouver dans des classes de vertébrés, supérieures à celle des Batraciens. En effet, le calcul montre que ces protéines peuvent éventuellement s'agréger."Les parvalbumines seraient alors présentes dans le myogène sous une forme multamérisée et une évolution vers l'agrégation de ces molécules, semblable à celle trouvée pour l'hémoglobine, suivrait parallèlement l'évolution des organismes".

2° Les protéines musculaires solubles de l'huître et de la carpe.

Nous venons de développer quelques particularités des protéines de faibles poids moléculaires rencontrées chez divers vertébrés inférieurs. Il existe d'autres caractères que les chercheurs cités ont mis en évidence et qu'il nous a semblé intéressant de comparer, sans prétention phylogénétique, à ceux des protéines musculaires des huîtres.

La carpe (*Cyprinus carpio*), vertébré inférieur aquatique, possède deux types de muscles bien différents du point de vue histologique, biochimique et physiologique : le muscle blanc à contraction rapide et le muscle rouge à contraction lente. A un premier examen, on peut relever des analogies

sur le plan physiologique, entre le muscle blanc de la carpe et la partie transparente de l'adducteur des huîtres.

Pour JEBSEN et HAMOIR (111)(112), les diagrammes d'ultracentrifugation des protéines solubles à faible force ionique et ceux du myogène de la plie ne présentent pas de différences qualitatives. Le pic lent reste entièrement en solution après dialyse contre l'eau; le pic moyen précipite dans la proportion de 25 % et le plus rapide dans la proportion de 50 %. Tout en faisant des réserves sur la valeur d'une comparaison des résultats obtenus par ultracentrifugation et chromatographie d'exclusion-diffusion, nous constatons des différences du même ordre entre les profils d'élution sur Sephadex G-100 des protéines solubles à faible force ionique et ceux du myogène du muscle adducteur de C. angulata (figure 37).

Comme ces auteurs, nous trouvons des différences entre les électrophorèses d'extraits à faible force ionique et celles de myogène (figure 53).

HAMOIR (78) estime pour les protéines solubles des muscles de la carpe, de la plie et de la morue que les diagrammes d'ultracentrifugation sont plus semblables entre eux que ne le sont leurs électrophorégrammes. Les électrophorégrammes des trois espèces d'huîtres que nous avons examinées présentent des différences importantes (figure 47) dont nous discuterons ultérieurement. Les profils d'élution sur Sephadex montrent des ressemblances en supposant que la zone Z d'O. edulis correspond au pic II des Crassostrea (figure 35).

On a souvent comparé les mobilités électrophorétiques des protéines solubles d'animaux divers. DUBUISSON (44), étudiant des extraits musculaires de Murex (mollusque gastéropode) et de grenouille, trouve dans les deux cas un groupe de trois substances dont les vitesses de migration sont semblables. Par contre, aucune des fractions protéiques du lapin ne possède les mêmes vitesses électrophorétiques que celles de la grenouille. HAMOIR (78) fait remarquer que les électrophorégrammes des protéines solubles dans les solvants de faible force ionique, obtenus chez les vertébrés inférieurs, sont très variables et caractéristiques de chaque espèce. Mais, ils possè-

dent en commun une mobilité moyenne plus élevée que celle des vertébrés à sang chaud.

Nous avons réalisé des électrophorégrammes d'extraits de muscle blanc de carpe à faible force ionique, sur acétate de cellulose et sur gel de polyacrylamide. Nous les avons reproduits sur la figure 58a. La comparaison avec l'huître (figures 43 et 47) montre des différences très sensibles quant au nombre, à la place et à l'intensité des bandes. Les figures 57b,c représentent des densitométries d'électrophorégrammes sur acétate de cellulose d'extraits de muscle blanc de carpe et de partie transparente d'adducteur de C. gigas réalisées dans des conditions identiques. Il apparaît que les fractions les plus importantes de C. gigas migrent plus rapidement que celles de la carpe.

FOCANT et PECHERE (58) ont isolé, en bloc, par chromatographie sur colonne de Sephadex G-75 les protéines de faibles poids moléculaires présentes chez certains vertébrés inférieurs. Par contre, chez les invertébrés, leurs résultats ont été négatifs.

Nous avons voulu comparer par chromatographie sur Sephadex un extrait de partie transparente d'adducteur de C. angulata et un extrait de muscle blanc de carpe.

Les résultats de la migration sur couche mince sont représentés à la figure 58b. On note que la fraction lente de la carpe est plus retardée que celle de l'huître.

Sur colonne (figure 59b) le profil d'élution de la carpe offre un aspect bien particulier et très différent de celui de l'huître (figure 59a). Le tableau XL permet de comparer les Kav des pics de C. angulata et de la carpe. On remarque des différences fort importantes particulièrement au niveau des fractions III.

Pour estimer les poids moléculaires au sommet des pics, nous avons reporté les valeurs R_b et Ve/Vo sur les courbes de standardisation précédemment établies (figure 40 et 42). Les résultats correspondant à la fraction

III sont repris au tableau XLI. Le pic III de la carpe donne à son sommet un poids moléculaire de 13.000 - 15.000 différent de celui de l'huître qui est de 19.000 - 21.000.

Opérant sur le myogène du Homard, JAMMAERS (109) obtient à l'ultracentrifugation quatre gradients : 3S, 7S, 15S et 22S. Notre pic III de l'huître correspond grossièrement à ce gradient 3S, tandis que le pic III de la carpe pourrait correspondre à un gradient de 1,5S.

Le pic III de l'huître absorbe plus à 280 qu'à 259 mμ. C'est l'inverse qui se produit pour la carpe. Nous avons réalisé les spectres ultraviolets des pics III, représentés à la figure 59a et b. Le spectre de l'huître a été décrit précédemment. On trouve un maximum à 280 mμ et les épaulements du tryptophanne. Le spectre de la carpe est bien différent : L'absorption à 280 mμ est faible. On remarque des maxima d'absorption à 253, 259 et 264 mμ. C'est un aspect typique de phénylalanine dont les maxima seraient décalés vers le rouge de 1 à 2 mμ.

Les protéines de faibles poids moléculaires de la carpe sont très acides et migrent rapidement à l'électrophorèse. On remarque (figure 56) que les protéines qui constituent le pic III des huîtres migrent aussi très rapidement.

Le tableau XLII résume quelques caractères communs et différentiels des protéines solubles du muscle blanc de la carpe et de la partie transparente du muscle adducteur de l'huître. Il existe,au niveau des protéines de faibles poids moléculaires, des différences très importantes entre la carpe vertébré inférieur et l'huître, invertébré qui se traduisent dans la valeur des poids moléculaires et dans l'aspect des spectres en ultraviolet.

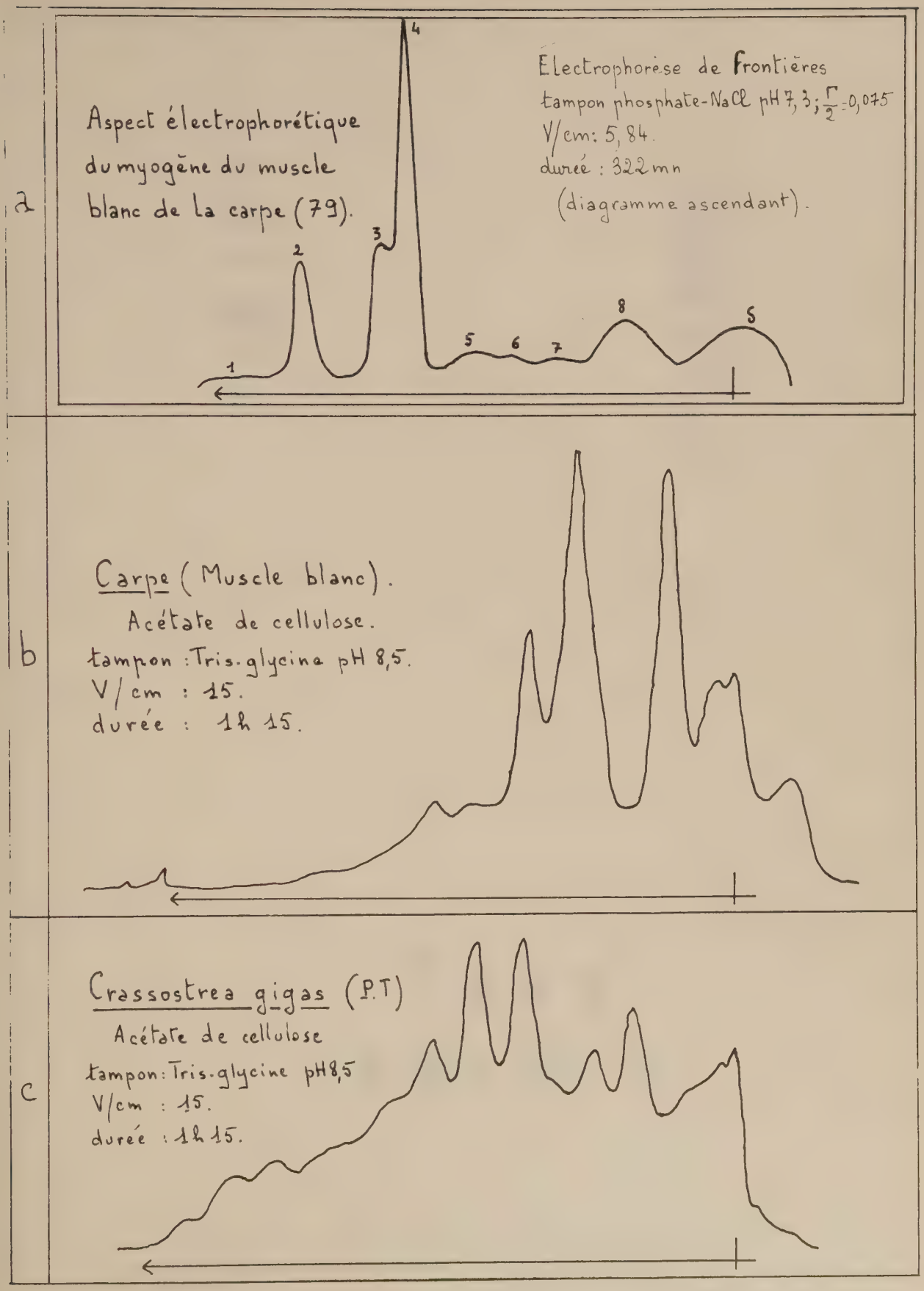


Figure 57.- a) Electrophorèse de frontières du muscle blanc de la carpe.
b et c) Electrophorèses sur acétate de cellulose du muscle blanc de la carpe et de la partie transparente de l'adducteur de C.gigas (densitométries).

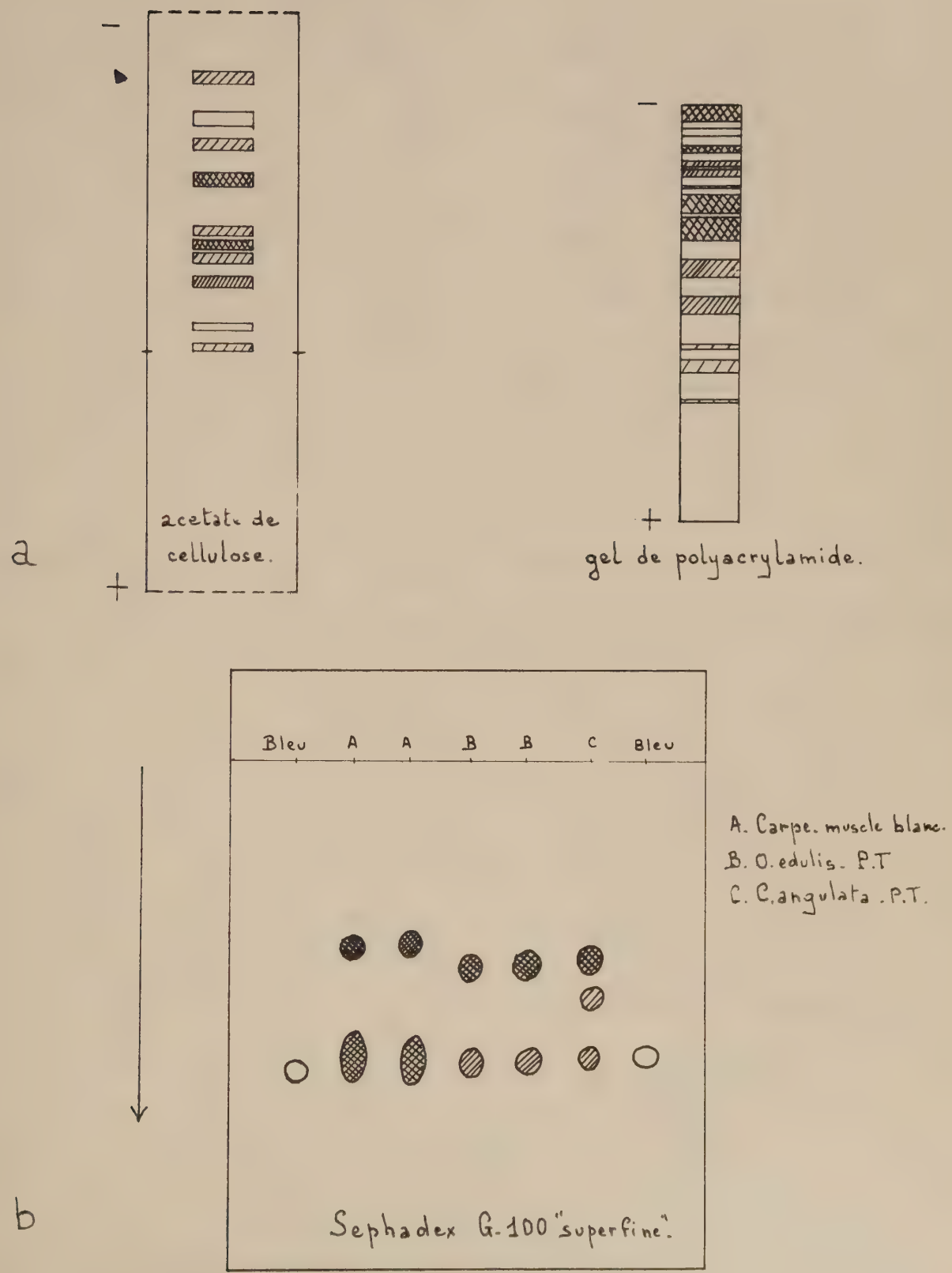


Figure 58.- a) Electrophorégrammes d'un extrait de muscle blanc de carpe (comparer avec ceux de l'huître réalisés dans les mêmes conditions fig.43 et 47)
b) Chromatographie en couche mince de divers extraits.

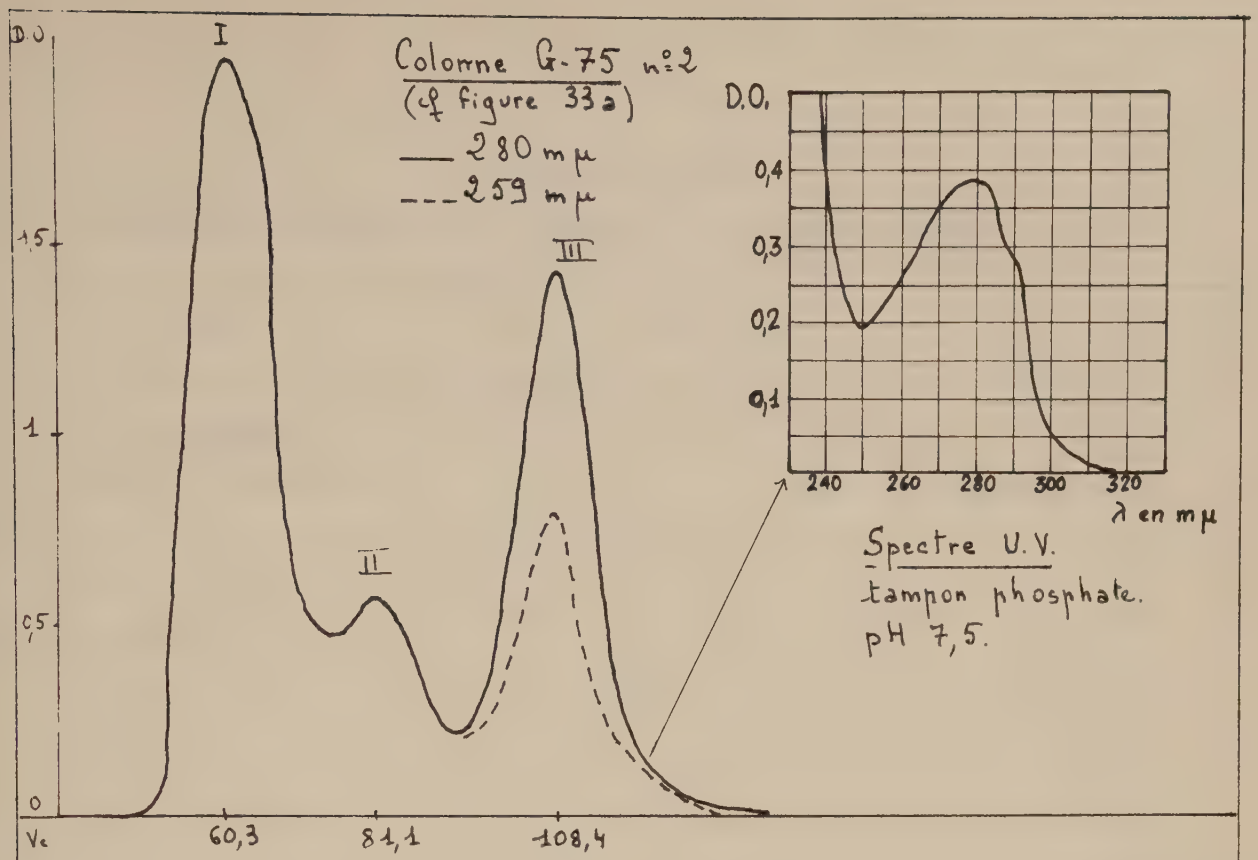


Figure 59a.- Profil d'élution de la partie transparente de C.angulata

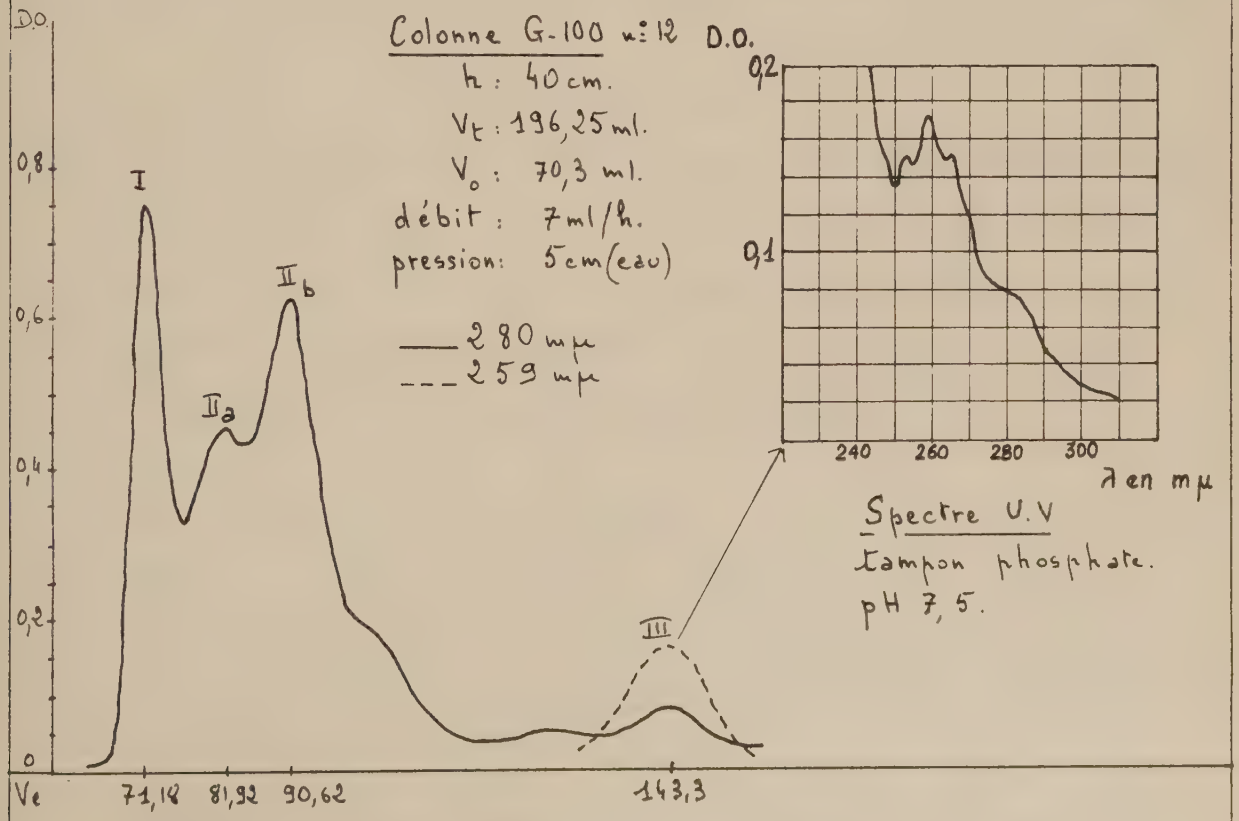


Figure 59b.- Profil d'élution du muscle blanc de la carpe.

T A B L E A U XL

Comparaison des Kav pour C.angulata et C.carpio (Sephadex G-100)

Kav	III	II II a	I b II b	I a
C. angulata Partie transparente	0,455	0,275	0,088	0,014
C. carpio Muscle blanc	0,579	0,161	0,092	0,007

T A B L E A U XLI

Estimation des poids moléculaires au sommet du pic III (Sephadex G-100)

Sur colonne			Sur plaque		
Fraction III	C.angulata PT	C. carpio M.B.		C.angulata PT	C.carpio M.B.
Ve / Vo	1,79	2,04	Rb	0,66	0,618
Log M	4,33	4,12	log M	4,27	4,17
M	21.500	13.000	M	19.000	15.000

TABLEAU XLII

Quelques caractères communs et différentiels entre le muscle blanc de la carpe et la partie transparente de l'adducteur de l'huître.

		C. carpio muscle blanc	Ostreidae partie transparente
Protéines solubles à faible force ionique.		Carpe, plie, morue : diagrammes d'ultracentrifugation plus semblables entre eux que les électrophorèses.	
			Huîtres : Profils d'élution en chromatographie d'exclusion-diffusion plus semblables entre eux que les électrophorèses.
		Mobilité électrophorétique moyenne plus élevée que celle des vertébrés à sang chaud.	
Différences entre protéines solubles à faible force ionique et myogène.		Pas de différence qualitative en ultracentrifugation.	
			Pas de différence qualitative en chromatographie d'exclusion-diffusion.
		Différences à l'électrophorèse	
Protéines de faible poids moléculaire.	P. M.	13.000 - 15.000	19.000 - 21.500
	Spectre	Prédominance de phénylalanine	" classique ", de constitution équilibrée
	Acidité	importante	

II - TAXONOMIE BIOCHIMIQUE

Nous avons déjà insisté sur l'intérêt taxonomique suscité par l'étude des protéines musculaires solubles des vertébrés et des invertébrés, notamment des mollusques.

Nous avons essayé de dégager quelques informations taxonomiques que l'on peut tirer des résultats obtenus dans l'analyse des protéines solubles du muscle adducteur des Ostreidae par les techniques que nous avons exposées et les applications que nous avons présentées.

A - LA STABILITE DU MUSCLE ADDUCTEUR

"En taxonomie biochimique, comme en taxonomie morphologique, les caractères importants sont ceux qui se maintiennent constants à travers le plus grand taux de variation des autres caractères" (FLORKIN - 55).

L'expérience a prouvé le bien fondé d'un choix tel que celui des protéines du pied des gastéropodes pour des études de taxonomie biochimique (34). Nous avons pensé que la nature des protéines solubles du muscle adducteur des Huîtres pouvait offrir le même intérêt en raison de l'homogénéité histologique des tissus qui le composent.

A propos des prélèvements, nous avons insisté sur les soins apportés à écarter les huîtres malades et à prélever le muscle dans les mêmes conditions en évitant toute élongation intempestive. Nous avons évité de laisser les huîtres plus de quelques heures en anaérobiose et avons comparé, autant que possible, des huîtres de même provenance, de même âge, appartenant au même lot, et conservées dans les mêmes conditions biologiques. Enfin pour minimiser les variations individuelles, un extrait a toujours été obtenu

à partir d'une vingtaine d'huîtres.

Les organes peuvent être influencés, à long terme, par différents facteurs externes et internes, créant des modifications plus ou moins profondes de leur constitution chimique. Nos recherches bibliographiques sur ce sujet ont mis en évidence la faible sensibilité du muscle à l'action de certains facteurs écologiques (salinité, fixation du Sr^{89}) et physiologiques (âge, reproduction et "pousse" de la coquille).

Action de la salinité

Les Ostreidae (du moins Crassostrea angulata et Ostrea edulis) sont des mollusques euryhalins ne possédant pas de régulation anisosmotique extracellulaire (15)(16)(56). Leur régulation osmotique est le seul fait de la régulation isosmotique intracellulaire dans laquelle les acides aminés libres jouent un grand rôle.

L'origine et le rôle de ces acides aminés libres sont précisés par FLORKIN (56) selon lequel :

- ils sont d'origine intracellulaire,
- les variations observées lorsque la salinité change se placent au niveau de la synthèse et de la dégradation des acides aminés eux-mêmes; elles ne sont pas la résultante de la modification de la vitesse de "turnover" de l'une ou l'autre protéine intracellulaire.

Il devrait donc y avoir peu ou pas de variation de la composante protéique cellulaire en passant d'une salinité donnée à une autre salinité.

Fixation du Sr^{89}

Lorsque l'on expose l'huître américaine C. virginica à l'eau de mer contaminée au Sr^{89}, 84 % de la radioactivité totale se concentre dans les valves; mais, dans les parties molles, on en retrouve 14,7 % qui se répartissent ainsi :

- manteau	4,1 %
- branchies	3,1 %
- muscle adducteur	2,4 %
- autres tissus	5,1 %

Cet exemple est en faveur de la faible action de l'environnement sur le muscle adducteur (241 bis).

Action de l'âge

CONNELL (28) a constaté les effets de l'âge sur les proportions des constituants électrophorétiques du muscle de la morue. FOCANT et PECHERE (58) ont indiqué que le myogène de la jeune carpe est plus riche en petites molécules que celui de la carpe adulte.

Nous n'avons pas comparé les protéines musculaires de l'huître très jeune (naissain) et de l'huître adulte. Mais, nous avons comparé celles d'O. edulis de 6 centimètres et d'O. edulis de 12 centimètres sans trouver de différences significatives.

Action de la pousse

La pousse de la coquille se fait par le bord du manteau et ne doit pas affecter considérablement le muscle adducteur. KAWAI (120 bis), étudiant l'activité de l'anhydrase carbonique chez l'"huître" perlière Pinctada martensii, a remarqué que cette activité déjà faible ne décroit que très légèrement dans le muscle adducteur, lorsque la taille de la coquille augmente. Cette enzyme est associée à la pousse de la coquille chez C. angulata, mais pas chez O. edulis.

Action de la reproduction

Le tableau XLIII reproduit celui de GALTSOFF (63) indiquant le poids relatif du muscle adducteur de six C. virginica adultes durant la saison du frai. Les changements chimiques qui se produisent dans les autres

organes n'affectent pas le poids du muscle adducteur.

TABLEAU XLIII

Poids relatif du muscle adducteur de six C. virginica. adultes (hauteur de 10 à 12,5 cm) pendant la saison du frai (Août) à Woods Hole, Mass (poids frais) 1951.

HUÎTRE	POIDS		Muscle adducteur
	Parties molles	Muscles adducteurs	poids total
	Grammes	Grammes	Pourcent.
Mâle avec les organes génitaux mûrs.	17.8	3.5	19.7
Mâle avec les organes génitaux mûrs	15.0	3.7	21.8
Femelle avec les organes génitaux mûrs	18.7	4.4	23.5
Femelle avec les organes génitaux mûrs	6.5	2.1	32.3
-Femelle ayant partiellement rejeté ses produits génitaux	6.5	2.3	35.3
-Huître de sexe non déterminé ayant complètement rejeté ses produits génitaux	5.2	2.2	42.3

LAPORTE (131) affirme que le muscle adducteur n'est pas directement affecté par la gamétogénèse, ce qui n'est pas le cas du manteau, ni de la glande digestive.

En résumé, s'il existe des variations de la composition protéique de l'adducteur de l'huître sous l'influence de divers facteurs, on peut penser qu'elles sont minimes surtout sur le plan qualitatif.

B - ESSAI D'INTERPRETATION TAXONOMIQUE DE NOS RESULTATS

Les résultats de nos déterminations sur les protéines solubles des muscles adducteurs des huîtres étudiées, ont été présentés dans un ordre de complexité croissante. Après la chromatographie d'exclusion-diffusion, nous pouvons indiquer la répartition des protéines en fonction de leurs poids moléculaires, et par électrophorèse sur acétate de cellulose, la répartition de ces mêmes protéines en fonction de leurs charges. Quant à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, elle fait intervenir les deux paramètres précédents et elle donne des résultats beaucoup plus fins et beaucoup plus complexes.

La comparaison qualitative fait déjà apparaître des similitudes et des différences intéressantes en taxonomie.

Le traitement des données quantitatives et semi-quantitatives que nous avons recueillies permet de préciser les résultats. Ces données figurent aux tableaux XXIII, XXIV, XXXV, XXXVI, XXXVII, XXXVIII. Nous comparerons certaines moyennes par le "test t", décelant ainsi d'éventuelles différences significatives entre deux moyennes.

Nous exposerons les caractères identiques marquants obtenus par chromatographie et électrophorèse chez les Crassostrea : angulata et gigas et chez O. edulis, avant de les comparer.

1 - Caractères marquants des huîtres étudiées

Caractères des Crassostrea

Les points communs les plus marquants entre les deux Crassostrea sont nombreux :

- les protéines solubles dans les solutions salines de faible force ionique sont extraites à des taux voisins;

- les diagrammes chromatographiques sur gel de Sephadex G-100, avec

leurs trois pics protéiques, sont sensiblement identiques qualitativement et quantitativement;

- les électrophorégrammes des extraits de muscles complets et de parties transparentes sur acétate de cellulose offrent, chez l'une et l'autre espèce, un groupe caractéristique de trois bandes de mobilités équivalentes;

- en gel de polyacrylamide, on remarque surtout la présence d'un groupe de trois bandes caractéristiques rapides, deux bandes typiques dans la zone intermédiaire et une bande importante dans la zone lente. La comparaison des moyennes des Rr des bandes homologues ne permet pas de déceler entre elles de différences significatives.

Caractères d'O. edulis

Les caractères sont, chez cette espèce, bien particuliers.

- les protéines solubles dans les solutions salines de faible force ionique ont une extractibilité faible;

- les profils chromatographiques d'extraits de partie transparente ou de muscle complet passés sur Sephadex G-100 montrent la faible teneur en protéines de poids moléculaires moyens;

- les électrophorégrammes de ces mêmes extraits sur acétate de cellulose font apparaître surtout une fraction importante;

- sur gel de polyacrylamide, on observe une seule bande importante au niveau de la zone rapide et une seconde bande caractéristique au niveau de la zone lente.

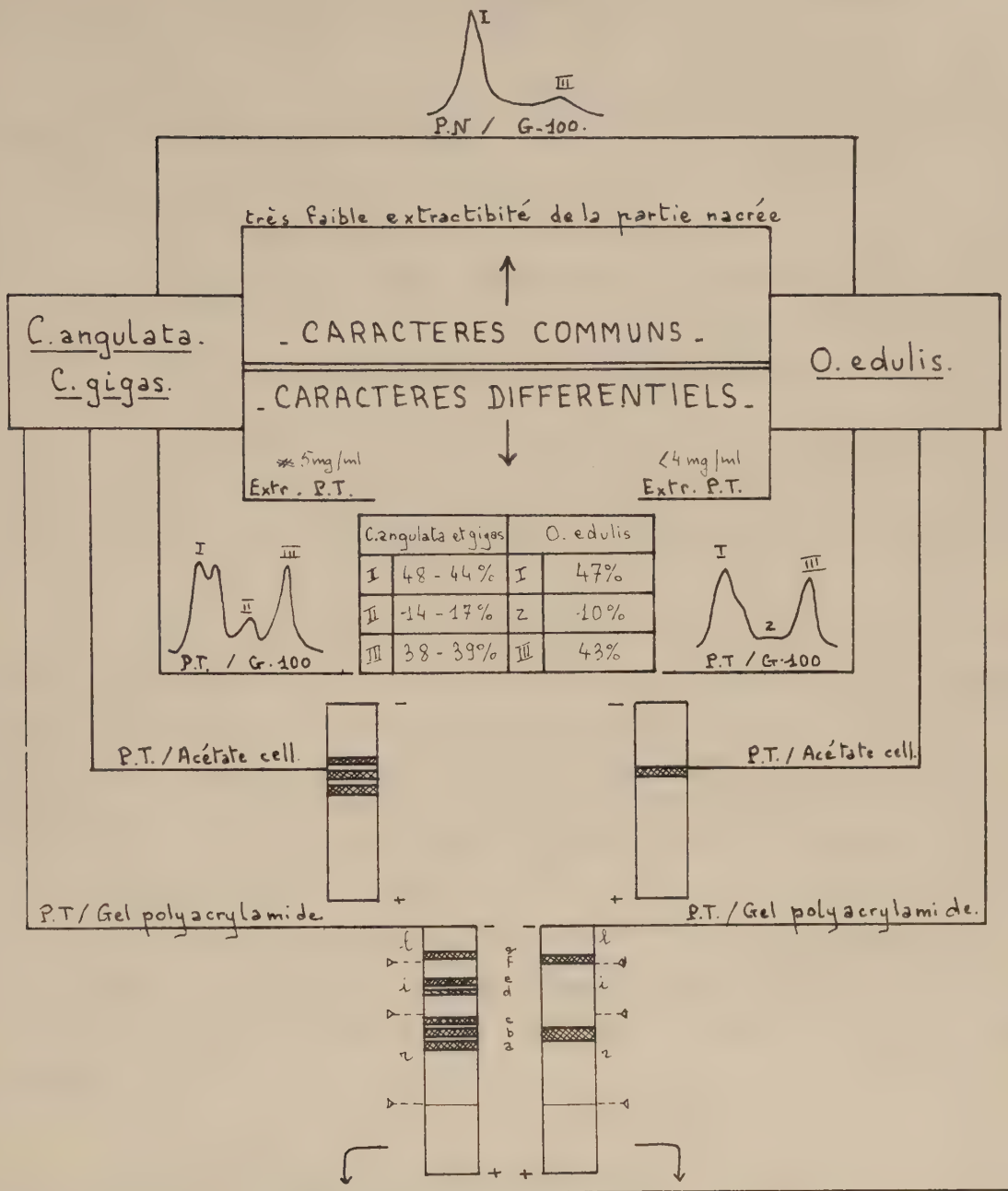
2 - Comparaison entre les Crassostrea et O. edulis

Le tableau XLIV présente en parallèle les principaux caractères des Crassostrea étudiées et d'O. edulis.

Au niveau des parties nacrées, on constate une ressemblance tout

TABLEAU XLIV

Comparaison entre les Crassostrea étudiées et O. edulis.



C. angulata et gigas		O. edulis	
I	48 - 44 %	I	47%
II	14 - 17 %	2	10 %
III	38 - 39%	III	43%

	R_r	C. angulata et C. gigas P.T.						O. edulis . P.T.			Différences des moyennes (test t).
zone	bandes	n		$\bar{x}$		s_m		n	$\bar{x}$	s_m	
l	g	6	7	0,182	0,179	0,008	0,004				0,182 et 0,199
	f	6	7					10	0,199	0,004	t calculé = 2,189. degrés de liberté 10+6-2=14 ; $t_{0,05}$=2,145. t calculé > $t_{0,05}$. Différence significative au niveau P=0,05.
i	e	6	7	0,248	0,247	0,008	0,002				
	d	6	7	0,315	0,319	0,006	0,002				0,604 et 0,616
r	c	6	7	0,534	0,533	0,007	0,003				
	b	6	7	0,601	0,604	0,008	0,003	10	0,616	0,005	t calculé = 1,749 degrés de liberté 10+7-2=15, $t_{0,05}$=2,131 t calculé < $t_{0,05}$ Différence non significative au niveau P=0,05
	a	6	7	0,674	0,673	0,006	0,004				

au moins dans les profils chromatographiques.

Les caractères différentiels correspondant aux extraits de parties transparentes sont assez nombreux :

- différences d'extractibilité,
- teneur plus ou moins importante en protéines de poids moléculaires moyens,
- différences marquantes entre les diagrammes électrophorétiques.

Nous avons indiqué sur le tableau les valeurs relatives des fractions de la partie transparente séparée sur G-100. Les chiffres des Crassostrea sont sensiblement identiques, mais ils diffèrent de ceux d'Ostrea edulis.

Les électrophorégrammes sur acétate de cellulose et en gel de polyacrylamide montrent des différences frappantes entre les deux Crassostrea et O. edulis. Ces différences en gel de polyacrylamide sont essentiellement l'absence de deux des trois bandes caractéristiques de la zone rapide, chez O. edulis, ainsi que l'absence de bandes caractéristiques dans la zone intermédiaire. Au-dessous, un tableau indique les Rr des principales bandes des Crassostrea qui sont extrêmement voisins. Après calcul, on relève qu'il n'y a pas de différences significatives entre les Rr des Crassostrea. Il faut souligner qu'il n'y a pas de différence significative entre le Rr de la seule bande rapide d'O. edulis et le Rr de la bande homologue des Crassostrea.

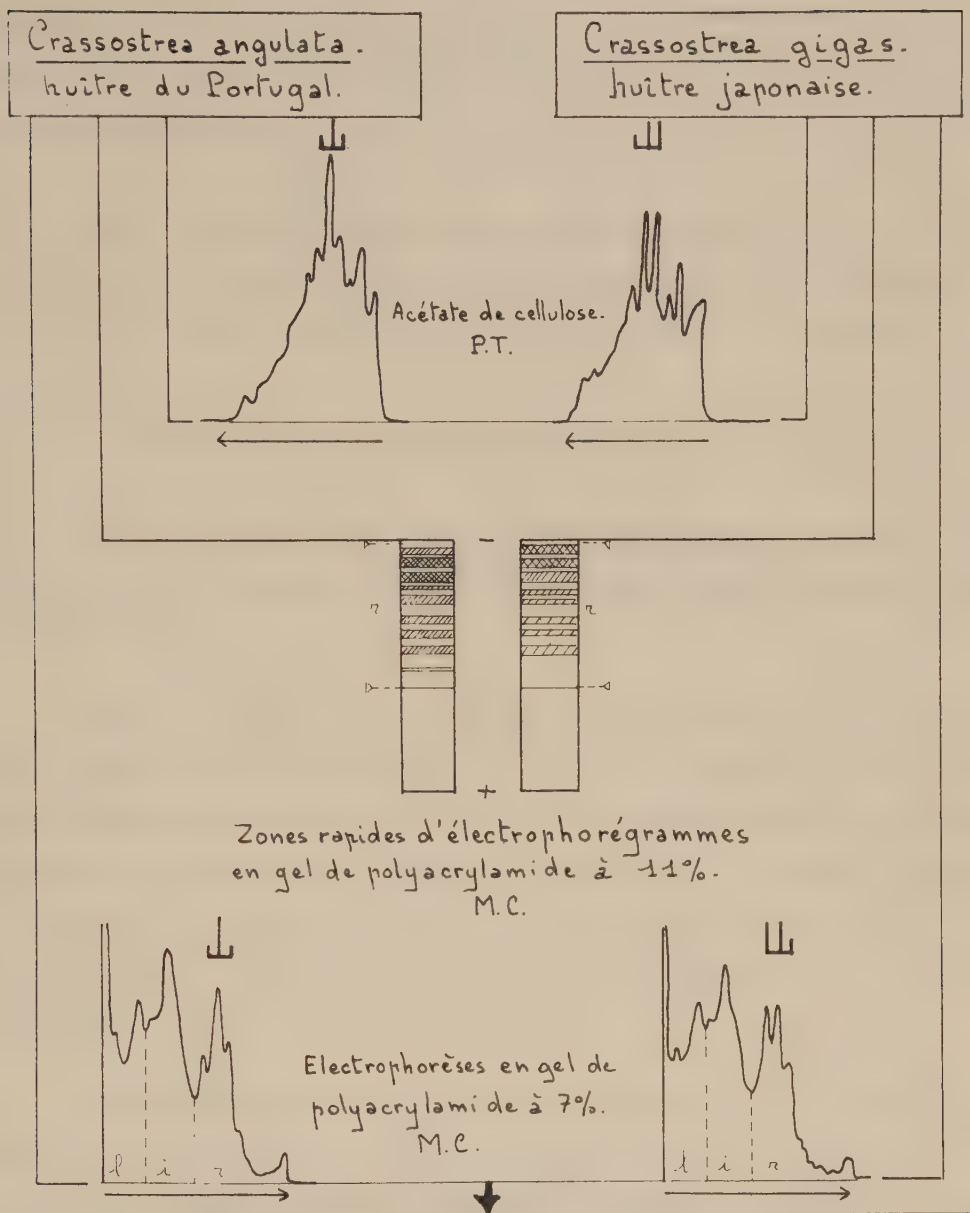
3 - Comparaison des deux Crassostrea

Un examen rapide des chromatogrammes et des électrophorégrammes pourrait amener à affirmer l'identité absolue des deux espèces. Cependant, une analyse plus fine des résultats permet de déceler des différences de deux ordres exposées au tableau XLV.

- différences concernant les petites fractions existant dans les diagrammes d'une seule espèce, particulièrement visible dans la zone rapide

TABLEAU XLV

Comparaison entre C.angulata et C.gigas



%	l		i		r					
					r total		3 bandes		très rapides	
	$\bar{x}$	s_m	$\bar{x}$	s_m	$\bar{x}$	s_m	$\bar{x}$	s_m	$\bar{x}$	s_m
C.a $_{n=10}$	22,90	0,51	31,52	0,58	34,14	0,29	25,24	0,68	8,90	0,78
C.g. $_{n=7}$	23,57	0,43	31,58	0,51	34,44	0,34	27,93	0,31	6,51	0,11
différences des moyennes. (test t).	Différences non significatives au niveau P = 0,05.				Différence non significative au niveau P=0,05.		t calculé = 3,134 degrés de liberté 10+7-2=15; $t_{0,05}$=2,131 $t_{0,01}$=2,947 t calculé > $t_{0,01}$ différence hautement significative pour P=0,01		t calculé = 2,524 t calculé > $t_{0,05}$ différence significative au niveau P=0,05	

des électrophorégrammes en gel de polyacrylamide à 11 %,

- différences dans l'importance relative de certaines fractions en électrophorèse sur acétate de cellulose et sur gel de polyacrylamide qui se traduisent dans la hauteur relative des pics.

Nous n'avons envisagé ici que les muscles totaux ou les parties transparentes. Il nous a paru prématuré de comparer les diagrammes électrophorétiques des parties nacrées, d'interprétation fort délicate.

4 - Essai d'interprétation et limites de la méthode

Les différences entre les deux Crassostrea d'une part, et O. edulis d'autre part, sont frappantes. Ces trois espèces appartiennent certes à deux genres différents.

Entre C. angulata et C. gigas, les différences sont en fait bien mineures : Elles consistent pour une part en la présence ou l'absence de quelques fractions très faibles sur les diagrammes électrophorétiques. Les différences existant dans l'importance relative de certaines fractions paraissent plus sérieuses. En effet, l'observation des profils et le calcul montrent des différences significatives au niveau de la zone rapide des électrophorégrammes en gel de polyacrylamide.

Ces différences sont peut-être spécifiques de l'espèce. Mais, les C. angulata ou huître du Portugal, étudiées, sont des huîtres de 4 ans tandis que les C. gigas ou huître japonaise n'avaient que 10 mois environ, cette différence d'âge est peut-être susceptible d'amener des variations dans les proportions de certains constituants. Rappelons que la zone rapide en électrophorèse est représentée surtout par les protéines de faibles poids moléculaires dont le pourcentage varie en fonction de l'âge chez les poissons (FOCANT et PECHERE - 58).

En faveur de l'identité de ces deux espèces qui présentent des points communs au niveau de leur anatomie et de leur physiologie, on pourrait,

sous la réserve exposée précédemment ajouter des analogies quant à leurs protéines solubles, ce qui confirmerait l'hypothèse de RANSON dont nous avons longuement parlé au début de notre travail. Nous connaissons bien les possibilités et les limites des méthodes que nous avons employées. Il ne semble pas possible de conclure avec ces seules méthodes à l'identité de deux fractions protéiques ayant même mobilité électrophorétique ou chromatographique sans que des études physico-chimiques plus précises et surtout des études immunologiques et enzymatiques aient été effectuées.

Cette voie, dans laquelle nous sommes déjà engagés, fera l'objet de travaux ultérieurs.

CONCLUSION

Le muscle adducteur de l'huître est formé de deux parties distinctes: une partie transparente, "pseudostriée", phasique et une partie nacrée, lisse, tonique. L'aspect et la composition ultrastructurale du matériel contractile de ce muscle, ainsi que sa physiologie ont surtout retenu l'attention des chercheurs. Les protéines solubles des parties nacrées et transparentes, mis à part un travail sur leur extractibilité , n'ont pas fait l'objet de travaux.

Les protéines solubles dans les solutions salines de faibles forces ioniques ($< 0,2$), le myogène, soluble dans l'eau et la globuline X, insoluble dans l'eau mais soluble dans les solutions salines de force ionique $> 0,005$, représentent les trois aspects des protéines solubles que nous avons étudiées. Nous avons choisi comme tampon d'extraction un tampon phosphate de pH 7,5 et de force ionique 0,05 et utilisé une méthode d'extraction différentielle pour séparer myogène et globuline X. Les techniques d'homogénéisation, de centrifugation et de dialyse ont été précisées.

Les extraits obtenus ont été lyophilisés. Leur teneur en protéines a été estimée par spectrophotométrie dans l'ultraviolet.

Le fractionnement des extraits protéiques a été réalisé par des méthodes chromatographiques et électrophorétiques se déroulant dans des systèmes poreux :

- chromatographie d'exclusion-diffusion sur gel de Sephadex (plaques et colonnes) où les molécules protéiques se séparent en fonction de leurs tailles,
- électrophorèse sur acétate de cellulose (bandes et blocs) pour laquelle le fractionnement s'effectue en fonction de la charge des molécules,
- électrophorèse en colonnes de gel de polyacrylamide, qui met en jeu la taille et la charge des molécules.

L'aspect analytique et l'aspect préparatif de ces méthodes ont pu être adaptés à nos problèmes. Ainsi, divers facteurs peuvent intervenir dans la bonne réalisation des fractionnements : réticulation du Sephadex et concentration en acrylamide du gel d'électrophorèse, composition des tampons, temps de migration, importance des quantités d'échantillons déposées et des colorants employés, artéfacts pouvant fausser l'interprétation.

La détection des fractions a fait appel à la densitométrie et à la spectrophotométrie. Nous avons pu apprécier la validité des paramètres de mesure habituellement utilisés.

Ces techniques adaptées, appliquées aux extraits protéiques des trois espèces d'huîtres étudiées nous ont conduit aux résultats que nous exposerons d'abord d'une manière analytique.

Nous avons confirmé la faible teneur des muscles adducteurs en protéines sarcoplasmiques, ce qui est en accord avec leur morphologie.

Les extraits protéiques des Crassostrea sont toujours plus concentrés que ceux d'Ostrea edulis. Les parties transparentes fournissent toujours des extraits plus concentrés que les parties nacrées.

L'estimation des poids moléculaires au sommet des pics de fractionnement des chromatogrammes d'exclusion-diffusion nous a conduit à répartir les protéines extraites en classes discrètes autour des poids moléculaires 20.000 (faibles), 40.000 (moyens), 80.000 ...

Les profils chromatographiques des protéines solubles des parties transparentes du muscle adducteur des Crassostrea sont très voisins, mais diffèrent de celui d'O. edulis sur lequel on remarque une faible teneur en protéines de poids moléculaires moyens. Les protéines solubles des parties transparentes sont de nature albuminique et globulinique.

Sur les profils des protéines solubles des parties nacrées, de nature globulinique essentiellement, très proches pour les trois espèces d'huîtres, les protéines de poids moléculaires moyens sont absentes.

La globuline X est surtout formée de protéines de poids moléculaires élevés.

Entre le profil d'élution du myogène et celui d'un extrait de muscle complet, il n'apparaît qu'une simple différence quantitative dans les valeurs relatives des fractions.

Nous avons étudié plus spécialement la fraction de faibles poids moléculaires des parties transparentes séparées par chromatographie d'exclusion-diffusion. Elle apparaît sous l'aspect d'un pic de bonne symétrie et ne contient pas d'acides nucléiques. Son spectre ultraviolet en tampon phosphate et à pH 7,5 est un spectre classique de protéine.

Une fraction qui se place sur les profils d'élution, après le pic de sel, c'est-à-dire, qu'elle est très fortement retardée, ne présente pas le caractère de protéine. Son spectre ultraviolet en tampon phosphate, à pH 7,5 présente un minimum d'absorption vers 226-228 mμ et un maximum à 259 mμ.

Les résultats électrophorétiques précisent les ressemblances et les différences déjà observées par chromatographie d'exclusion-diffusion.

Sur acétate de cellulose gélatineux, le fractionnement des extraits de muscles complets et de parties transparentes est convenable, mais celui des extraits des parties nacrées n'est pas satisfaisant.

La résolution de l'électrophorèse en colonne de gel de polyacrylamide est excellente. Le nombre des fractions est doublé par rapport à l'acétate de cellulose gélatineux, aussi bien pour les muscles complets que pour les parties transparentes. D'autre part, le fractionnement des extraits des parties nacrées peut être réalisé par cette méthode.

Par l'une et l'autre méthode de séparation électrophorétique, nous ne décelons, entre les deux Crassostrea que de légères différences que l'on peut d'ailleurs préciser sur gel de polyacrylamide en faisant varier la concentration du monomère. Par contre, les électrophorégrammes d'O. edulis sont très différents.

Le myogène et la globuline X se répartissent différemment sur les électrophorégrammes.

Nous avons combiné entre elles les méthodes de fractionnement électrophorétique et chromatographique.

L'électrophorèse,en colonnes de gel de polyacrylamide, de fractions séparées sur bloc d'acétate de cellulose gélatineux met en évidence le phénomène de filtration moléculaire : à mobilité électrophorétique égale, les plus grosses molécules sont retardées.

L'électrophorèse des différentes fractions (pics) séparées par chromatographie d'exclusion-diffusion préparative, montre leur hétérogénéité électrophorétique et leur hétérogénéité moléculaire. Les protéines de faibles poids moléculaires migrent rapidement à l'électrophorèse.

Cette combinaison de méthodes peut amener rapidement à la purification de diverses fractions.

En vue d'un essai d'interprétation biologique des résultats obtenus, nous avons étudié comparativement les protéines solubles de la partie transparente du muscle adducteur de l'huître et celles du muscle blanc de la carpe.

Les chromatogrammes et les électrophorégrammes des extraits de ces deux muscles à contraction rapide sont très différents.

On observe cependant des points communs dans le comportement analytique général des extraits. Il existe des différences du même ordre entre myogène et protéines solubles dans les solutions salines de faibles forces

ioniques chez les poissons et les huîtres. Les protéines solubles à faible force ionique des muscles d'huîtres, comme celles de la carpe, ont une mobilité électrophorétique moyenne plus élevée que celle des vertébrés à sang chaud. Ces protéines, chez des genres différents de poissons présentent des diagrammes d'ultracentrifugation plus semblables entre eux que ne le sont leurs électrophorégrammes. Il en est de même chez les deux genres d'huîtres étudiés si l'on compare profils chromatographiques et électrophorégrammes.

Nous avons particulièrement comparé les protéines de faibles poids moléculaires. Chez la carpe, comme chez l'huître, ces protéines migrent rapidement à l'électrophorèse. L'analogie ne peut être poussée plus loin : "les parvalbumines" du muscle blanc de la carpe, de très faibles poids moléculaires, très riches en phénylalanine n'ont pas leur équivalent dans la partie transparente du muscle adducteur de l'huître.

Au début de notre travail, nous avons rappelé les données taxonomiques classiques concernant la famille des Ostreidae en insistant sur les difficultés rencontrées au niveau de l'espèce. L'hypothèse selon laquelle C.angulata Lmk, l'huître portugaise et C. gigas Thunberg, l'huître japonaise ne formeraient qu'une seule et même espèce a été soulignée.

En possession de données biochimiques nouvelles relatives à la composition du muscle adducteur des huîtres et notamment des protéines solubles, nous nous sommes demandés s'il n'était pas possible d'éclairer la taxonomie classique des Ostreidae par des considérations biochimiques tout en lui restant subordonné.

Il existe des points communs importants entre les chromatogrammes et les électrophorégrammes de Crassostrea angulata et de Crassostrea gigas, alors que ceux d'O. edulis sont entièrement différents.

La comparaison fine des deux Crassostrea montre cependant de légères différences plus particulièrement au niveau des proportions relatives de fractions importantes, ce qui pourrait s'expliquer par des différences d'âge entre

les deux espèces étudiées.

Pour conclure, peut-être, à l'identité des deux espèces C.angulata et C. gigas, si proches par leur anatomie et leur physiologie, nous envisageons d'étudier plus particulièrement les variations des protéines en fonction de l'âge, et de compléter nos investigations par des études enzymatiques et immunologiques.

Nous avons abordé au cours de ce travail l'étude des protéines solubles du muscle cardiaque de l'huître, dont les électrophorégrammes sont bien particuliers. Nous avons fait en outre quelques expériences d'anaérobiose et de conservation des huîtres en jeûne absolu, pour préciser l'influence de ces conditions de vie sur les protéines. Ces expériences sont insuffisantes pour nous permettre une conclusion même provisoire. Nous nous proposons de les reprendre ultérieurement.

" Muscle research is not a field of "the quick kill", but it is a field of hard-earned living fact and a graveyard of premature theory "

S. SEIFTER and P.M. GALLOP

B I B L I O G R A P H I E

1. AGOSTONI (A.), VERGANI (C.), LOMANTO (B.).- J. Lab. Clin. Med., 1967, 69, 522-529.

2. ANDREWS (P.).- Biochem. J., 1964, 91, 222-233.

3. ANDREWS (P.).- In : Protides of the Biological Fluids, ed. by H. Peeters (Proc. 14th Coll., Bruges, 1966), Amsterdam, Elsevier, 1967, 573-578

4. APARICIO RUIZ (D.).- Arch. Zootec., Esp., 1963, 12, 209-251.

5. ARNOLD (H.), PETTE (P.).- European J. Biochem., 1968, 6, 163-171.

6. BAILEY (K.).- Public. Stazione zool. di Napoli, 1958, 29, 96-108.

7. BAILEY (J.L.).- Techniques in Protein Chemistry. Amsterdam, Elsevier, 1967.

8. BAKER (C.M.A.).- Canad. J. Biochem., 1966, 44, 853-859.

9. BERGMEYER (H.V.).- Methods of Enzymatic Analysis. Acad. Press, New-York, 1963.

10. BERGSTÖM (K.).- Acta Med. Scand., 1966, n° 445, 127-131.

11. BIERRY (H.) GOUZON (B.), MAGNAN (C.).- C. R. Acad. Sci., 1937, 204, 1895-1897.

12. BISTOCCHI (M.).- Arch. Sci. Biol. (Bologne), 1961, 45, 53-60.

13. BOTTAZZI (P.).- J. Physiol. (Lond.), 1897, 21, 1-21.

14. BOWDEN (J.).- Intern. Rev. Cytol., 1958, 7, 295-335.

15. BRICTEUX - GRÉGOIRE (S.), DUCHATEAU- BOSSON (G.), JEUNIAUX (C.) FLORKIN (M.).- Arch. Int. Physiol., 1964, 72, 267-275.

16. BRICTEUX - GRÉGOIRE (S.), DUCHATEAU - BOSSON (G.), JEUNIAUX (C.) FLORKIN (M.).- Arch. Int. Physiol., 1964, 72, 835-842.

17. BRONN (H.G.).- In : F. MARCEAU. Arch. Zool. Exp., 1909, 2, 395-469.

18. BROOME (J.).- Nature, 1963, 199, 179-180.

19. CANALCO (Société).- Documentation générale sur la "disc électrophorèse". Bethesda, Md., Canalco, s.d.

20. CHAPHEAU (M.).- Bull. Stat. Biol. Arcachon, 1932, 29, 85-152.

21. CHARPENTIER (J.)., GOUTEFONGEA (R.).- Ann. Biol. Anim., 1963, 3, 381-389.

22. CHARPENTIER (J.), GOUTEFONGEA (R.).- Nature, 1964, 201, 1325-1326.

23. CHENG (T.C.).- In : Taxonomic Biochemistry and Serology, ed. by A. Leone, New-York, The Ronald Press, 1964, 659-666.

24. CHENG (T.C.), SANDERS (B.G.),- Proc. Penn. Acad. Sci., 1962, 36, 72-83.

25. CLARKE (J.T.).- Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1964, 121, 428-436.

26. COLLYER (D.M.).- J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 1961, 41, 683-693.

27. CONNELL (J.J.).- Biochem. J., 1953, 54, 119-126.

28. CONNELL (J.J.).- Biochem. J., 1953, 55, 378-388.

29. CONNELL (J.J.).- Biochem. J., 1958, 69, 5-12.

30. CZOK (R.), BÜCHER (T.).- In : Advances in Protein Chemistry. Ed. by M.L. Ansoh and J.T. Edsall, New-York/Londres, Acad Press, 1960, 15, 315-415.

31. DAVIS (B.J.).- Disc electrophoresis, Part II. Reprinted by Distillation Products Industries, 1962.

32. DAVIS (B.J.).- Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404-427.

33. DAVIS (G.M.)., LINDSAY (G.K.).- Bull. Amer. Malacol. Union, 1964, 31, 20-21.

34. DAVIS (G.M.), LINDSAY (G.K.) - Malacologia, 1967, 5, 311

35. DAYAN (J.)., WILSON (I.B.).- Biochim., Biophys. Acta, 1964, 81, 620-623.

36. DENUCE (J.M.), CUSHING (J.E.).- In : Protides of the Biological Fluids. Ed. By H. Peeters (Proc. 11th Coll., Bruges, 1963), Amsterdam, Elsevier, 1964, 146-149.

37. DERANCOURT (J.), LEBOR (A.S.), ZUCKERKANDL (E.).- Bull. Soc. Chim. biol., 1967, 49, 577-607.

38. DETERMANN (H.).- Experientia, 1962, 18, 430-431.

39. DETERMANN (H.), MICHEL (W.).- Z. Anal. Chem., 1965, 212, 211-218.

40. DEUTICKE (H.J.).- Z. Physiol. Chem., 1934, 224, 216.

41. DEUTSCH (H.F.), McSHAN (W.H.).- J. Biol. Chem., 1949, 180, 219-234.

42. DEL CAMPO (G.B.).- Correspondance personnelle.

43. DMYTRENKO (M.P.), PKHAKADZE (G.O.).- Ukr. Biokhim. Zh., 1968, 40, 196-200.

44. DUBUISSON (M.).- Expos. Ann. Biochem. Méd., 1948, 9, 1-72.

45. DUBUISSON (M.).- Muscular contraction. Springfield, Ill., C. C. Thomas, 1954.

46. DUBUISSON (M.), ROUBERT (L.).- C. R. Soc. Biol., 1947, 141, 802-805.

47. DUBUISSON - BROUHA (A.).- Bull. Acad. Roy. Med. Belgique (Classe des Sciences), 1953, 39, 5° série, 121-129.

48. ELLIOTT (G.F.).- J. mol. Biol., 1964, 10, 89-104.

49. ENGELMANN (T.W.).- Arch. Ges. Physiol., 1881, 25, 538.

50. EPSTEIN (W.V.), TAM (M.).- J. Chromatog., 1961, 6, 258-263.

51. FASELLA (P.), GIARTOSIO(A.), TURANO (C.).- In : Thin-Layer Chromatographie.Ed.Marini-Bettolo, . Amsterdam, Elsevier, 1964, 205-211.

52. FAZEKAS de St GROTH (S.), WEBSTER (R.G.), DATYNER (A.).- Biochim. Biophys. Acta, 1963, 71, 377-391.

53. FERRIS (G.F.).- Standford Univ. Publ., Univ. Ser., Biol. Sci., 1928, 5, 101-269.

54. FLODIN (P.).- J. Chromatog., 1961, 5, 103-115.

55. FLORKIN (M.).- In: Taxonomic Biochemistry and Serology. Ed. by A. Leone (International Conference on Taxonomic Biochemistry, Physiology and Serology. The University of Kansas, Sept. 1962). New-York, The Ronald Press, 1964, 51-74.

56. FLORKIN (M.).- Aspects moléculaires de l'adaptation et de la phylogénie.- Paris, Masson, 1966 (Les Grands problèmes de la Biologie, vol. 2).

57. FLORKIN (M.), BLUM (H.F.).- Arch. Intern. Physiol., 1934, 38, 353-364.

58. FOCANT (B.), PECHERE (J.F.).- Arch. Intern. Physiol., 1965, 73, 334-354.

59. FOL (H.).- C. R. Acad. Sci., 1888, 106, 306.

60. FORMANEK (K.), KASCHNITZ (R.), PATSCH (I.).- Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1967, 348, 1352-1354.

61. FRANC (A.).- In : Traité de Zoologie, Dir. P. Grassé. Paris, Masson, 1960, V, 1845-2133.

62. FROMAGEOT (C.), SCHNEK (G.).- Biochim. Biophys. Acta, 1950, 6, 113-122.

63. GALTSOFF (P.S.).- Fishery. Bull. Fish & Wildlife Service, 1964, 64.

64. GELOTTE (B.).- J. Chromatog., 1960, 3, 330-342.

65. GILES (B.G.).- J. Sci. Food Agric., 1962, 13, 264-268.

66. GODEAUX (J.).- Bull. Acad. Roy. Méd. Belg. (Classe des Sciences) 1954, 40, 948-961.

67. GORNALL (A.C.), BARDAWILL (C.S.), DAVID (M.M.).- J. Biol. Chem., 1949, 177, 751-766.

68. GRANATH (K.A.), KVIST (B.E.).- J. Chromotog., 1967, 28, 69-81.

69. GRANT (G.H.), EVERALL (P.H.).- In : Protides of the Biological Fluids. Ed. H. Peeters, Amsterdam, Elsevier, 1965, 321-326.

70. GRASSE (P.P.), POISSON (R.A.), TUZET (O.).- Zoologie. I. Invertébrés, Paris, Masson, 1961.

71. GRASSMANN (W.), HANNIG (K.), KNEDEL (M.).- Dtsch. Med. Wschr., 1951, 76, 333.

72. HAAN (A.M.F.H.).- Biochim. Biophys. Acta, 1953, 11, 258-269.

73. HALL (C.E.), JAKUS (M.A.), SCHMITT (F.O.).- J. Applied Phys. 1945, 16, 459-465.

74. HAMOIR (G.).- Swedish Inst. Food. Preserv. Res., 1953.

75. HAMOIR (G.).- In : Advances in Protein Chemistry, Ed. M.L. Anson & J.T. Edsall, New-York/Londres, Acad. Press, 1955, 10, 227-288.

76. HAMOIR (G.).- Arch. Intern. Physiol. Bioch., 1955, LXIII, fasc. 4, (suppl.).

77. HAMOIR (G.).- Biochem. J., 1957, 66, 29 P (Proceedings).

78. HAMOIR (G.).- Fishing News (Fish. in Nutrition), 1962.

79. HAMOIR (G.), KONOSU (S.).- Biochem. J., 1965, 96, 85-97.

80. HANSON (J.), LOWY (J.).- In : The Structure and function of Muscle. Ed. G.H. Bourne, New-York/Londres, Acad. Press, 1960, I, 265-335.

81. HANSON (J.), LOWY (J.).- Proc. Roy. Soc., 1961, B 154, 173-196.

82. HANSON (J.), LOWY (J.).- IN : Biochemistry of Muscle contraction. Ed. J. Gergely, Boston, Little, Brown, 1964, II, part V, 400-411.

83. HANSON (J.), LOWY (J.).- Brit. Med. Bull., 1965, 21, 264-271.

84. HANSON (L.A.), JOHANSSON (B.G.), RYMO (L.) - Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 391-398.

85. HARTSHORNE (D.J.), PERRY (S.V.).- Biochem. J., 1962, 85, 171-177.

86. HASLEWOOD (G.A.D.).- In : Chemotaxonomy and Serotaxonomy. Ed. J.G. Hawkes, Londres/New-York, Acad. Press, 1968, 159-172 (Systematics Assoc., spec. vol., n° 2)

87. HELANDER (E.).- Acta Physiol. Scand., 1957, 41, suppl. 141, 1-99.

88. HENROTTE (J.G.).- Nature, 1955, 176, 1221.

89. HENROTTE (J.G.).- Biochim. Biophys. Acta, 1960, 39, 103-121.

90. HESLOP-HARRISON (J.).- In : Chemotaxonomy and Serotaxonomy. Ed. J.G. Hawkes. Londres/ New-York, Acad. Press, 1968, 279-284 (Systematics Assoc., Special Volume, n° 2).

91. HEWITT (R.E.), WORD (L.W.), HASKINS (E.F.), HASKINS (C.P.).- Copeia, U.S.A., 1963, 2, 296-303.

92. HILLMAN (R.E.).- Syst. Zool., 1964, 13, 12-18.

93. HILLMAN (R.E.).- Chesapeake Sci., 1965, 6, 115-116.

94. HJERTÉN (S.).- In : Protides of the Biological Fluids. Ed. H. Peeters (Proc. 14th Coll., Bruges, 1966), Amsterdam, Elsevier, 1967, 553-561.

95. HJERTÉN (S.), Jerstedt (S.), TISELIUS (A.).- Anal. Biochem., 1965, 11, 219-223.

96. HOPKINS (H.S.).- Anat. Rec., 1930, 47, 305.

97. HOYLE (G.).- Comparative physiology of the nervous control of muscular contraction. Cambridge. University Press, 1957, 147 p.

98. HOYLE (G.).- In : Physiology of Mollusca. Ed. K. M. Wilbur & C. M. Yonge. New-York/Londres, Acad. Press, 1964, I, 313-351.

99. HUGHES (B.P.).- Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 794-800.

100. HUMPHREY (G.F.).- Physiol. comp. et oecol. , 1949, 1, 366-375.

101. HUMPHREY (G.F.).- Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 1950, 28, 151-160.

102. HUNEEUS-COX (F.).- Science, 1964, 143, 1036-1037.

103. HUSSON (R.).- Glossaire de Biologie animale. Paris, Gauthier-Villars. 1964.

104. IMAI (T.), SAKAI (S.).- Tohoku J. Agric. Res., 1961, 12, 125-171.
in B.A. 38, n° 12854.

105. INOUE (T.).- Tokyo Gakugei, Daigaku, Kenkyn Hokoku, 1960, 11, 27-36.
in C.A 60, 7, 8380 h.

106. IREDALE (T.).- Sci. Rep. Gr. Barrier Reef Exped., 1939, 5, 391-403.

107. JACOB (J.J.C.).- Biochem. J., 1947, 41, 83-94.

108. JACOB (J.J.C.).- Biochem. J., 1948, 42, 71-79.

109. JAMMAERS (C.).- Arch. Intern. Physiol., 1960, 68, 478-494.

110. JAMMAERS (C.).- Arch. Intern. Physiol., 1963, 71, 773-787.

111. JEBSEN (J.W.), HAMOIR (G.).- Acta Chem. Scand., 1958, 12, 351-352.

112. JEBSEN (J.W.), HAMOIR (G.).- Acta Chem. Scand., 1958, 12, 1851-1868.

113. JOHANSSON (B.G.), RYMO (L.).- Acta Chem. Scand., 1962, 16, 2067-2068.

114. JOHNSON (W.H.), KAHN (J.S.), SZENT-GYÖRGYI (A.G.).- Science, 1959, 130, 160-161.

115. JOHNSON (OW.), STEPHEN (W.P.).- Nature, 1964, 203, 207-209.

116. JOLY (M.).- A Physico-chemical Approach to the Denaturation of Proteins. Londres/New-York, Acad. Press, 1965.

117. JOUSTRA (M.K.).- In : Protides of the Biological Fluids. Ed. H. Peeters (Proc. 14th Coll., Bruges, 1966), Amsterdam, Elsevier, 1967, 533-541.

118. JULLIEN (A.), RICHARD (J.G.). C. R. Soc. Biol. (Paris), 1936, 122, 1106-1108.

119. JULLIEN (A.), RICHARD (J.G.).- C. R. Soc. Biol. (Paris), 1936, 122, 1108-1110.

120. KADYKOV (V.V.), YURÉV (V.A.), PRINTSEV (M.D.), MATROSOVA (A.V.).- Zh. Evolyutsionnoi Biokhim. i Fiziol., 1965, 1, 205-212. in: C.A, 63, 8641 b.

120 bis. KAWAI (D.K.).- In : Physiology of Mollusca. Ed. K.M. Wilbur & Yonge New-York/Londres, Acad. Press, 1964, I, p. 231.

121. KAY (C.M.), SMILLIE (L.B.).- IN : Biochemistry of Muscle Contraction. Ed. J. Gergely. Boston, Little, Brown, 1964, II, part V, 379-399.

122. KIRK (R.L.), MAIN (A.R.), BEYER (F.G.).- Biochem. J., 1954, 57, 440-442.

123. KOBAYASHI (S.).- Sci. Rept. Tohoku Univ., 4th Ser., Biology. 1929, 4 193-205 (in : BAUGMAN, p. 128, Cf. Ouvrages généraux).

124. KOBAYASHI (S.).- Nippon Suisan Gakkaishi, 1964, 30, 893-907 (in : Chem. Abstr. 1964, 2467 g).

125. KOBAYASHI (S.).- Biol. Bull., 1964, 126, 414-422.

126. KOHN (J.).- Clin. Chim. Acta, 1957, 2, 297-303.

127. KOHN (J.).- Clin. Chim. Acta, 1958, 3, 450-454.

128. KOHN (J.), FEINBERG (J.G.).- Documentation SHANDON (Londres), 1965, n° 11.

129. KONOSU (S.), HAMOIR (G.), PECHERE (J.F.).- Biochem. J., 1965, 96, 98-112.

130. KORRINGA (P.).- Quart. Rev. Biol., 1952, 27, 266-308 et 339-365.

131. LAPORTE (M.).- Les protides de C. angulata Lmk de l'étang de Thau et leurs variations saisonnières. Thèse Pharmacie Montpellier, 1966, N° 53.

132. LATHE (B.H.), RUTHVEN (C.R.).- Biochem. J., 1956, 62, 665-674.

133. LAURENT (T.C.), KILLANDER (J.).- J. Chromatog., 1964, 14, 317.

134. LEENHARDT (H.).- Ann. Inst. Océan., 1926, Nouv. Sér., III. 90 p.

135. LEMCHE (H.), WINGSTRAND (K.G.).- In : Traité de Zoologie, Dir. P. Grassé, Paris, Masson, 1960, V, 1787-1821.

136. LILLEVIK (H.A.), SCHLOEMER (C.L.).- Science, 1961, 134, 2042-2043.

137. LOOSANOFF (V.L.), NOMEJKO (C.A.).- Biol. Bull., 1951, 101, 151-156.

138. LOOSANOFF (V.L.), DAVIS (H.C.).- In : Advances in Marine Biology, ed. F.S. Russell. Londres/New-York, Acad. Press, 1963, I, 2-136.

139. LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.), RANDALL (R.J.).- J. Biol. Chem., 1951, 193, 266-275.

140. MAHLER (H.R.).- Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1961, 92, 426-439.

141. MAIZEL (J.V.) jr.- Science, 1966, 151, 988-990.

142. MANCUSO (V.M.).- J. Assoc. Offic. Agric. Chemists, 1964, 47, 841-844.

143. MARCAUD (L.).- C. R. Soc. Biol., 1960, 154, 1209-1212.

144. MARCEAU (F.).- Arch. Zool. Exptl. Gén., 1909, 7, 295-469.

145. MARGO (Th.).- S.-B. Akad. Wiss. Wien., 1860, 39, 559, in : Arch. zool. exptl. gén., 1909, 2, 295-469.

146. MAURER (H.R.).- Disk-Electrophorese. Berlin, Walter De Gruyter & Co, 1968.

147. MAYR (E.).- In : Taxonomic Biochemistry and Serology. Ed. A. Leone (Intern. Conf. On Taxonomic biochemistry, physiology and serology, Univ. Of Kansas, Sept. 1962.). New-York, 1964, 13-32.

148. MEHL (W.J.), SEXTON (E.L.).- Fed. Proc., 1942, 1, 125.

149. MICHL (H.), PASTUSZYN (A.) - Microchim. Ichnoanal. Acta, 1963, 880-886. In Chem. Abstr., 60, 7124e.

150. MILSTEIN (C.P.).- Biochem. J., 1967, 103, 634-640.

151. MOCHINAGA (T.), TAGUCHI (A.).- Shakuhin Eiseigaku Zasshi, 1963, 4, 217-222. in C.A : 60,4,4698g.

152. MOMENT (G.B.).- In : Abstract - Canalco, Bethesda, Md, U S A. 1965.

153. MONNET (R.), MORE (P.), POISBEAU (J.), MORE (M.T.).- Bull. Soc. Pharm. Ouest, 1966, 8, 97-103.

154. MORE (P.).- Travail non publié.

155. MORE (P.), MORE (M.T.), POISBEAU (J.), MONNET (R.).- Bull. Soc. Pharm. Ouest, 1966, 8, 135-142.

156. MORE (P.), MORE (M.T.), POISBEAU (J.), MONNET (R.).- Bull. Soc. Pharm. Ouest, 1968, 10, 19-30.

157. MORELAND (B.), WATTS (D.C.), VIRDEN (R.).- Nature, 1967, 214, 458-462.

158. MORELAND (B.), WATTS (D.C.).- Nature, 1967, 215, 1092-1094.

159. MORRIS (C.).- J. Chromatog. 1964, 16, 167-175.

160. MORRIS (C.J.O.R.).- In : Protides of the Biological Fluids, Ed. H. Peeters (Proc. 14th Coll., Bruges, 1966), Amsterdam, Elsevier, 1967, 543-551.

161. MORRIS (C.J.O.R.), MORRIS (P.).- Separation Methods in Biochemistry. Londres, Pitman & Sons. 1963.

162. MORTON (R.K.).- In : Methods in Enzymology. Ed. S.P. Colowick and N.O. Kaplan. New-York/ Londres, Acad. Press.,1955, I, 25.

163. MORTON (J.E.), YONGE (C.H.).- In : Physiology of Mollusca. Ed. K.M. Wilbur and C.M. Yonge. New-York/Londres, Acad. Press, 1964, I, 1-58.

164. MOURAY (H.), MORETTI (J.), FINE (J.M.).- Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 993-1003.

165. MUNIER (R.L.).- Mises au point de Chimie analytique, 1967, 15° série, 203-301.

166. MURPHY (J.B.), KIES (M.W.).- Biochim, Biophys. Acta, 1960, 45, 382-384.

167. NEELIN (J.M.).- Canad. J. Biochem., 1963, 41, 369-387.

168. NEELIN (J.M.).- Canad. J. Biochem., 1964, 42, 1383-1395.

169. NEELIN (J.M.), ECOBICHON (D.J.).- Canad. J. Biochem., 1966, 44, 735-741.

170. NELSON (T.C.).- J. J. Morph., 1938, 63, 1-61.

171. NIKKILA((O.E.), LINKO (R.R.).- Biochem. J., 1955, 60,-242-247.

172. NUMACHI (K.I.).- Am. Naturalist, 1962, 96, 211-217.

173. OGSTON (A.G.).- Brit. Med. Bull., 1966, 22, 105-108.

174. ORNSTEIN (L.).- Disc electrophoresis. Part I. Repr. by Distillation products Industries (Division of Eastman Kodak Cy),1962.

175. ORNSTEIN (L.).- Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1964, 121, 321-349.

176. PAYNE (W.R.) Jr.- J. Assoc. Offic. Agric. Chemists, 1963, 46, 1003-1005.

177. PECHERE (J.F.).- Comp. Biochem. Physiol., 1968, 24, 289-295.

178. PECHERE (J.F.), HAMOIR (G.), KONOSU (S.), FOCANT (B.).- 6ème Congrès international de Biochimie, 1964 (Abstracts).

179. PECHERE (J.F.), FOCANT (B.).- Biochem. J., 1965, 96, 113-118.

180. PERRY (S.V.).- In : Muscle, Ed. W.M. Paul, E. E. Daniel, C.M.Kay & G. Monckton. Oxford, Pergamon Press, 1965, 29-42.

181. PHARMACIA (Société).- Sephadex, Théorie et pratique de la filtration sur gel. Uppsala, 1967.

182. PHARMACIA (Société).- Sephadex : filtration sur gel en couche mince. Uppsala, 19..

183. PIRONT (A.), HAMOIR (G.).- Arch. Internat. Physiol., 1966, 74, 521-522.

184. PIRONT (A.), HAMOIR (G.), CROKAERT (R.).- Arch. Internat. Physiol., 1968, 76, 1-25.

185. POGLAZOV (B.F.).- Structure and functions of contractile proteins. New-York/Londres, Acad. Press, 1966.

186. POISBEAU (J.), MORE (P.), MORE (M.T.).- Le Croisic et l'Ostréiculture. Bull. Soc. Sci. Nat. Ouest France, 1968, 65, 17 pp.

187. POMERANZ (Y.).- Chemist-Analyst, 1965, 54, 57.

188. PORATH (J.).- Nature, 1962, 196, 47-48.

189. PORATH (J.), FLODIN (P.).- Nature, 1959, 183, 1657-1659.

190. PORATH (J.), BENNICH (H.).- Arch. Biochem. Biophys., 1962, Suppl. I, 152-156.

191. POTTER (V.R.).- In : Methods in Enzymology. Ed. S.P. Colowick & N.O. Kaplan. New-York/Londres, Acad. Press, 1955, I, 10-15.

192. POULIK (M.D.).- Nature, 1957, 180, 1477-1479.

193. POULIK (M.D.), SMITHIES (O.).- Biochem. J., 1958, 68, 636-643.

194. RADOLA (B.J.).- J. Chromatog., 1968, 38, 61-90.

195. RAIMBAULT (R.).- Revue Trav. Inst. Pêch. Marit., 1966, 30, 224-250.

196. RAMPONI (G.) TREVES (C.), GUERRITOIRE (A.).- Arch. Biochem. Biophys., 1967, 120, 666-670.

197. RANKE (E.), BRAMSTEDT (F.).- Arch. Fischereiwiss., 1954, 5, 43-46.

198. RANSON (G.).- Bull. Mus. Hist. Nat., Paris, 1939, 11, 318-332.

199. RANSON (G.).- Bull. Mus. Hist. Nat., Paris, 1940, 12, 119-128.

200. RANSON (G.).- Bull. Mus. Hist. Nat. Belg., 1948, 24, 1-12.

201. RANSON (G.).- Revue scient., Paris, 1948, 86, 469-473.

202. RANSON (G.).- Bull . Mus. Hist. Nat., Paris, 1948, 20, 514-516.

203. RANSON (G.).- J. Conchyliol., 1950, 90, 195-200.

204. RANSON (G.).- Les Huîtres, Biologie, Culture. Paris, Lechevalier, 1951.

205. RANSON (G.).- Bull. Inst. Océanogr., 1960, n° 1183, 1-41.

206. RANSON (G.).- Revue Trav. Inst. Pêch. Marit., 1967, 31, 127-199 et 207-274.

207. RAVEN (C.P.).- Morphogenesis : The analysis of molluscan development. Oxford, Pergamon Press, 1966.

208. RAYMOND (S.).- Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1964, 121, 350-365.

209. RAYMOND (S.), WEINTRAUB (L.S.).- Science, 1959, 130, 711.

210. RAYMOND (S.), NAKAMICHI (M.), AVRELL (B.).- Nature, 1962, 195, 697-698.

211. RENARD (S.).- Bull. Acad. Roy. Belg., Classe des Sciences, 1952, 5° série, 38, 1195-1210.

212. ROBERTS (G.P.).- J. Chromatog., 1966, 22, 90-94.

213. ROBERTSON (J.D.).- J. Exp. Biol., 1953, 30, 277-296.

214. ROSE (F.), OSTEUX (B.), ROSE (G.), TRAN VAN KY (P.).- Bull. Soc. Zool. Fr., 1966, 91, 345-352.

215. ROULE (L.).- C. R. Acad. Sci., 1888, 106, 872.

216. RÜEGG (J.C.).- Biochem. J., 1958, 69, 46 P.

217. RÜEGG (J.C.).- Proc. Roy. Soc. (Londres), SériesB. 1961, 154, 224-249.

218. RUEGG (J.C.).- In : Biochemistry of Muscle contraction. Ed. J. Gergely. Boston, Little, Brown, 1964, II, part V, 412-421.

219. SADIKOVA (N.V.), MATJUSHIVEV (V.R.).- Ukrajin. biokhim. Zh., 1966, 38, 618-624. In : Bull. Signal., 28-12-9308.

220. SANTAMARIA (R.), CIOFFI (L.A.).- Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1962, 38, 1373-6 et 1376-8.

221. SANTAMARIA (R.) GRANATO-CORIGLIANO (G.), BENEDETTO (C.D.), CIOFFI (L.A.). - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1963, 39, 2069-2072.

222. SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J.C.).- C. R. Soc. Biol., 1958, 152, 1705-1707.

223. SCHMEER (Sister M.R.), HUALA (C.V.).- Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1965, 118, 603-610.

224. SCHWALBE (G.).- Arch. Mikr. Anat., 1869, 5, 205.

225. SCOPES (R.K.).- Biochem. J., 1964, 91, 201-207.

226. SCOPES (R.K.).- Biochem. J., 1968, 107, 139-150.

227. SEIFTER (S.), GALLOP (P.M.).- In : The Proteins. Ed. H. Neurath. New-York/Londres, Acad. Press, 1966, IV, 153-458.

228. SERBAN (M.).- Revue roumaine de Biochimie, 1965, 2, 367-377.

229. SERBAN (M.) TANASESCU (D.).- Stud. Cercet. Biochim., 1963, 6, 559-572.

230. SLATER (G.G.).- Anal. Biochem., 1968, 24, 215-217.

231. SMITHIES (O.).- Biochem. J., 1955, 61, 629-641.

232. SMITHIES (O.).- Biochem. J., 1959, 71,585-587.

233. SOKAL (R.R.).- In : Taxonomic Biochemistry and Serology. Ed. A. Leone (Internat. Conf. On Taxonomic biochemistry, physiology and serology. Univ. of Kansas, Sept. 1962), New-York, 1964, 33-48.

234. SOROF (S.), YOUNG (E.M.), McBRIDE (R.A.), COFFEY (C.B.).- Arch. Biochem., 1966, 113, 83-96.

235. STAHL (E.), ed. - Thin-Layer Chromatography. New-York, Acad. Press, 1965, 553 p.

236. STAMM (M.D.).- Rev. esp. Fisiol., 1964, 20, 39-41.

237. STICKLAND (R.G.).- Anal. Biochem., 1965, 10, 108-119.

238. STRANSKY (Z.), SRCH (M.).- J. Chromatog., 1967, 28, 146-147.

239. SZENT - GYÖRGYI (A.G.).- In : The Structure and Function of Muscle. Ed. G.H. Bourne, New-York/Londres, Acad. Press, 1960, II, 1-54.

240. SZENT - GYÖRGYI (A.G.).- In : Biochemistry of Muscle Contraction. Ed. J. Gergely, Boston, Little, Brown, 1964, II, part V, 371-373.

241. TANASESCU (D.).- Rev. Roumaine Biochem., 1967, 4, 143-154.

241. bis TEMPLETON (W.L.).- In : The effects of Pollution on Living Material. Ed. W.B.Yapp. (Symposia of the Institute of Biology, n° 8), Londres, 1959, 125-140.

242. TERMIER (H.)., TERMIER (G.). Evolution et Biocinèse. Les Invertébrés dans l'histoire du monde vivant. Paris, Masson, 1968.

243. TOMBS (M.P.), SOUTER (F.), MacLAGAN (N.F.).- Biochem. J., 1959, 71, 13 P-14 P.

244. TOMBS (M.P.), SOUTER (F.), MacLAGAN (F.).- Biochem. J., 1959, 73, 167-171.

245. TOMBS (M.P.), AKROYD (P.).- Shandon Instrument Application, 1967, Janvier, n° 18, 16 p.

246. TRAN VAN KY (P.), ROSE (F.), LAUDE (F.).- C. R. Acad. Sci., 1962, 255, 366-367.

247. TRAVIS (D.F.), FRANCOIS (C.J.), BONAR (L.C.), GLIMCHER (M.J.).- J. Ultrastruct. Res., 1967, 18, 519-550.

248. TSUYUKI (H.), ROBERTS (E.).- J. Fish. Res. Board, Canada, 1961, 18, 637-640.

249. TSUYUKI (H.), ROBERTS (E.), GADD (R.E.A.).- Canad. J. Biochem., 1962, 40, 919-927 et 929-936.

250. TSUYUKI (H.), ROBERTS (E.).- J. Fish. Res. Board, Canada, 1963, 20, 101-104.

251. TSUYUKI (H.), ROBERTS (E.), VANSTONE (W.E.).- J. Fish. Res. Board Canada, 1965, 22, 203-213.

252. TSUYUKI (H.), ROBERTS (E.), VANSTONE (W.E.), MARKERT (J.R.).- J. Fish. Res. Board Canada, 1965, 22, 215-217.

253. TSUYUKI (H.), ROBERTS (E.).- J. Fish. Res. Board Canada, 1965, 22, 767-773.

254. TWAROG (B.M.).- J. gen. Physiol., 1967, 50, 157-169.

255. UEDA (T.) SHIMIZU (Y.), SIMIDU (W.).- Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 1964, 30, 352-356. in B.S. 26-12-1969.

256. URIEL (J.).- Bull. Soc. Chim. biol., 1966, 48, 969-982.

257. URIEL (J.), BERGES (J.).- C. R. Acad. Sci., 1966, 262, 164-167.

258. VERGANI (C.), STABILINI (R.) AGOSTONI (A.).- J. Chromatog., 1967, 28, 135-138.

259. WADDELL (W.J.).- J. Lab. Clin. Med., 1956, 48, 311-314.

260. WARBURG (O.), CHRISTIAN (W.).- Biochem.Z., 1941, 310, 384-421.

261. WATABE (N.), KOBAYASHI (S.).- In : Physiology of Mollusca. Ed. K.M. Wilbur and C.M. Yonge. New-York/Londres, Acad. Press.,1964, I, 250.

262. WHITAKER (J.R.).- Anal. Chem., 1963, 35, 1950-1953.

263. WIELAND (T.), DETERMANN (H.).- J. Chromatog., 1967, 28, 2-12.

264. WILLIAMS(D.E.), REISFELD (R.A.).- Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1964, 121, 373-381.

265. WILLIAMSON (J.), ALLISON (A.C.).- Lancet, 1967, II, 123-126.

266. WOODS (K.R.), PAULSEN (E.C.), ENGLE (R.L.J.) PERT (J.H.).- Science, 1958, 127, 519-520.

267. WRIGHT (C.A.).- J. Limn. Soc. (Zool.), 1959, 44, 222-237.

268. WRIGHT (C.A.), HARRIS (R.H.), CLAUGHER (D.).- Nature, 1957, 180, 1489.

269. WRIGHT (C.A.),ROSS (G.C.).- Ann. Trop. Méd. Parasitol., 1963, 57, 47-51. in C.A: 64, 2, 2223 g.

270. WRIGHT (C.A.), ROSS (G.C.).- Bull. Org. mond. Santé, 1965, 32, 709-712.

271. WRIGHT (C.A.), ROSS (G.C.).- Bull. Org. mond. Santé, 1966, 35, 727-751.

272. WRIGHT (S.T.C.).- Nature, 1962, 193, 334-337.

273. YAKOULEV.(N.N.), KRASNOVA (A.F.), CHAGOUETS (N.P.).- Effect Use, disuse neuromuscular functions. (Proc. Symp. Liblice near Prague, Czech., 1962, 461-463. in : C.A, 62, 4402 a.

274. YONGE (C.M.).- Mém. Mus. Roy. Hist. Nat. Belg., 1936, 3, 77-100.

275. YONGE (C.M.).- Trans. Roy. Soc. Edin ., 1953, 62, 443-478.

276. YONGE (C.M.).- Oysters. Londres, Collins, 1960, 209 p.

277. ZUCKERKANDL (L.), PAULING (L.).- J. Theoret. Biol., 1965, 8, 357-366.

- - -

OUVRAGES GENERAUX

(Zoologie, Sciences de la Mer, Biochimie, Techniques)

- AUDUBERT (R.), De MENDE (S.).- Les principe de l'électrophorèse. P.U.F. 1957.
- AZOULAY (E.), COHEN (D.).- Cours et exercices de Statistiques. S.E.L.E.S., 1967.
- BAILEY (J.L.).- Techniques in Protein Chemistry. Amsterdam/Londres/New-York, Elsevier, 1967.
- BAUGHMAN (J.F.).- An annotated Bibliography of Oysters with Pertinent Material on Mussel and other Shellfish and an Appendix on Pollution. Tex. A. & M. Res. Found, College Station, 1948.
- BIER (M.I.), éd.- Electrophoresis. Theory, Methods and Applications. New-York, Acad. Press., 1959, Vol. I ; 1967, Vol. II.
- BOURNE (G.H.), éd.- The Structure and Function of Muscle. New-York/Londres, Acad. Press., 1960, I, II, III.
- BOYER (A).- Les Coquillages comestibles., Paris, P.U.F., 1968 (Coll. "Que sais-je ?").
- DETERMANN (H.).- Gel Chromatography. New-York, Springer-Verlag. 1968.
- FLORKIN (M.), MASON (H.S.), éd.- Comparative Biochemistry. New-York/Londres, Acad. Press. 1960 : II ; 1962 : IV.
- FLORKIN (M.), STOTZ (E.H.), éd.- Comprehensive Biochemistry. Amsterdam, Elsevier, 1963, Vol. 7.et 8.

- GIRARD (M.F.).- Exploitation des résultats de l'électrophorèse par l'analyste et le clinicien. In : Problèmes actuels de Biochimie appliquée, Paris, Masson, 1967, Première Série, pp. 174-207.

- GRASSE (P.P.), dir.- Traité de Zoologie, Paris, Masson, 1952, Tome I, fasc. 1 ; 1960, Tome V, fasc. 2.

- HAWKES (J.G.), éd.- Chemotaxonomy and Serotaxonomy. Published for the Systematics Association by Acad. Press. 1968, Special Volume n° 2.

- JAVILLIER (M.), POLONOWSKI (M.), FLORKIN (M.), BOULANGER (P.), LEMOIGNE (M.), ROCHE (J.), WURMSER (R.), éd.- Traité de Biochimie générale Paris, Masson, 1959, I, II, III.

- LAMBERT (L.).- Les Coquillages comestibles., Paris, P.U.F., 1950. (Coll. "Que sais-je ? ").

- LE GALL (J.V.).- Valeur nutritive et valeur thérapeutique de l'Huître. Paris, Off. Scient. et Tech. Pêches marit. (Notes et Rapport N° 2).

- LISON (L.).- Statistique appliquée à la biologie expérimentale. La planification de l'expérience et l'analyse du résultat. Paris, Gauthier -Villars, 1968, 1 vol.

- LOISELEUR (J.).- Techniques de Laboratoire. Paris, Masson, 3ème éd. 1963, Tome I.

- LOWY (R.), MANCHON (P.).- Eléments de Statistiques appliqués à la Biologie. S.l.n.d. Olivetti. Vol. I.

- MAURER (H.R.).- Disk-Elektrophorese. Berlin, Walter de Gruyter, 1968.

- MORRIS (C.J.O.R.), MORRIS (P.).- Séparation Methods in biochemistry. Londres, Pitman, 1963.

- NEURATH (H.), éd.- The Proteins. Composition, Structure and Function. New-York/Londres, Acad. Press, 1963 : I; 1964 : II;, 1965 : III; 1966 : IV.

- RANSON (G.).- Les Huîtres; biologie, culture, Bibliographie. Monaco, Bull. Inst. Océanogr., 1952, n° 1001, 134 p.

- RUSSELL (F.S.), éd. - Advances in Marine Biology. Londres/New-York, Acad. Press, 1963 : I; 1964 : II; 1965 :III.

- STAHL (E.), éd. - Thin-Layer Chromatography. Berlin, Heidelberg; New-York, Springer Verlag & Acad. Press, 1965.

- WIEME (R.J.).- Agar Gel Electrophoresis. Amsterdam, Elsevier, 1965.

- WILBUR (K.M.), Yonge (C.M.), éd. - Physiology of Mollusca. New-York/Londres, Acad. Press, 1964 : I; 1966 : II.

- WILLARD (H.H.), MERRITT (L.L.), DEAN (J.A.).- Méthodes physiques de l'analyse chimique. Paris, Dunod, 1965.

- WILLIAMS (C.A.), CHASE (M.W.), éd. - Méthods in immunology and immunochemistry. New-York/londres, Acad. Press, 1967 : I; 1968 : II.

- WUNDERLY (C.).- Electrophorèse sur papier. Paris, Vigot, 1956.

P E R I O D I Q U E S

régulièrement consultés au cours des travaux

- "Cultures marines. Rivages de France". Revue de l'Ostréiculture et de la Mytiliculture.- R. Krier, dir. Paris, Presse Périod. prof.
- Journal de Conchyliologie, P.H. Fischer, dir. Paris, Lechevalier.
- Revue des Travaux de l'Institut des pêches maritimes. J. Furnestin dir., Paris.
- " Science et pêche ". Bulletin d'information et de documentation de l'Institut scientifique et technique des pêches maritimes. J. Furnestin, dir., Paris.

Table des matières

Page

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

TAXONOMIE DES OSTREIDAE

Taxonomie classique 4

Identification des genres 7

Identification des espèces 12

Taxonomie biochimique 18

Application de la taxonomie biochimique à la classification des Mollusques 20

exposé chronologique des travaux 21

classification des travaux et discussion 27

DEUXIEME PARTIE

LE MUSCLE ADDUCTEUR DES OSTREIDAE

Aspect phylogénétique 32

Aspect ontogénétique 33

Le muscle adducteur de l'huître adulte 35

anatomie - morphologie 35

histologie 37

les protéines de structure et leur localisation 42

la fonction tonique de la partie nacrée du muscle adducteur 44

autres particularités des parties nacrées et transparentes 45

différence entre O. edulis et C. angulata 46

TROISIEME PARTIE

METHODES D'EXTRACTION DES PROTEINES

Les grandes fractions protéiques musculaires 49

Les problèmes posés par l'extraction 51

Analyse des principaux travaux 52

Nos méthodes d'extraction 56

Les animaux 56

Transport et stockage éventuel au laboratoire 56

page

Prélèvement des muscles 57
Homogénéisation 60
les solutions d'extraction 62

Centrifugation et dialyse 65
Conservation des extraits 67
Détermination de la teneur en protéines 68
Extraction différentielle des myogènes et de la globuline X 69
Variantes 71

QUATRIEME PARTIE

METHODES DE FRACTIONNEMENT DES PROTEINES

I) Chromatographie d'exclusion-diffusion 75

A - Chromatographie en couche mince sur gel de Sephadex

Matériel et méthode

1 - préparation des gels 77
2 - confection des plaques 79
3 - cuves à chromatographie 80
4 - développement 81
5 - révélation des chromatogrammes 82
6 - estimation qualitative et semi-quantitative des chromatogrammes 83

Etude de quelques cas particuliers

1 - quantité d'échantillon déposée 84
2 - étude du temps de développement 84
3 - choix d'un gel 85
4 - exploitation densitométrique des chromatogrammes 86

B - Chromatographie sur colonne de gel de Sephadex

Matériel et méthode

1 - matériel utilisé 88
2 - gonflement des gels, charge de la colonne 89
3 - chromatographie 91
4 - détection des fractions 92
5 - mesure de divers paramètres 93
6 - choix des gels 94

II) Electrophorèse sur acétate de cellulose gélatineux

A - Electrophorèse analytique

- préparation des bandes et tampons 96
- dépôt de l'échantillon et électrophorèse 97
- fixation, coloration, décoloration, transparisation et conservation 98
- estimation des électrophorégrammes 99

page

B - Electrophorèse préparative

- préparation des bandes et tampons 100
- dépôt de l'échantillon et électrophorèse 100
- repérage et récupération des fractions 101
- conservation 101

III) Electrophorèse en gel de polyacrylamide

A - Méthodes d'électrophorèse en gel de polyacrylamide 103

a - méthode de Raymond 104
b - méthode de Ornstein et Davis ou "disc electrophorèse" 104
c - méthodes simplifiées 106

B - Méthode adoptée pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide 107

- cellule d'électrophorèse et générateur 108
- préparation des tubes de migration 108
- préparation des colonnes de gel 109
- mise en place des colonnes de gel sur la cellule 110
- préparation et mise en place des échantillons 111
- électrophorèse 111
- fixation et coloration des électrophorégrammes 112
- décoloration et conservation des électrophorégrammes 113
- estimation qualitative et semi-quantitative des électrophorégrammes 113

C - Adaptation de la méthode à quelques cas particuliers

1) influence des tampons et des gels 114
2) influence de la quantité d'échantillon déposée 118
3) influence de la coloration, décoloration augmentation de volume des gels 119

CINQUIEME PARTIE

APPLICATIONS DES TECHNIQUES A L'ETUDE DES PROTEINES DU MUSCLE ADDUCTEUR D'OSTREIDAE

I) Détermination de la teneur en protéines 125

II) Applications de la chromatographie d'exclusion-diffusion 127

A - Chromatographie sur couche mince

- résultats 128
- comparaison 131
- cas particuliers 132

a) myogène et globuline X 132
b) vieillissement d'une solution protéique 132

page

B - Chromatographie sur colonne

1) Action de différents facteurs sur les profils chromatographiques 133

a) influence de la réticulation du Sephadex 133
b) influence de la vitesse d'élution 134
c) influence des méthodes de détection 134

2) Comparaison des profils d'élution

a) profils ; Kav 135
b) pourcentages des fractions 136

3) Particularités de quelques fractions

a) fractions I, II et III 137
b) fraction IV 137

C - Estimation des poids moléculaires

Estimation sur plaque 139
Estimation sur colonne 140

III) Applications de l'électrophorèse sur acétate de cellulose et en gel de polyacrylamide

A - Electrophorèse sur acétate de cellulose gélatineux

1) description des électrophorégrammes 144
2) comparaison des parties transparentes 146
3) résultats obtenus avec divers tampons 146
4) méthode préparative 148
5) considérations générales 148

B - Electrophorèse en gel de polyacrylamide

1) description des électrophorégrammes 149
2) comparaison entre les espèces 154

a) comparaison des densitométries 155
b) Rr et pourcentages 155

3) étude de quelques cas particuliers 156

a) emploi du gel à 11% et de la coloration au coomassie 156
b) myogène et globuline X 156
c) extraits obtenus à l'aide de tampons de forces ioniques plus élevées 156
d) incidence du mode de conservation des extraits 157
e) considérations générales 157

IV) Essais d'emploi combiné des méthodes

1) Electrophorèse préparative sur acétate de cellulose et électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide 159

2) Chromatographie préparative sur colonne de Sephadex et électrophorèses analytiques 160

a) sur acétate de cellulose 160
b) sur gel de polyacrylamide 161

page

SIXIEME PARTIE

ESSAIS D'INTERPRETATION BIOLOGIQUE DES RESULTATS

I) Comparaison des protéines du muscle adducteur de l'huître et des muscles squelettiques de la carpe 164

1) les protéines de faibles poids moléculaires de certains myogènes 165

2) les protéines musculaires solubles de l'huître et de la carpe 168

II) Taxonomie biochimique

A - La stabilité du muscle adducteur 172

- action de la salinité 173
- fixation du Sr^{89} 173
- action de l'âge 174
- action de la pousse 174
- action de la reproduction 174

B - Essai d'interprétation taxonomique de nos résultats 176

1) caractères marquants des huîtres étudiées 176
2) comparaison entre les Crassostrea et O. edulis 177
3) comparaison des deux Crassostrea 178
4) essai d'interprétation et limites de la méthode 179

CONCLUSION

Vu, le Président de Thèse,
R. MONNET

Vu, le Doyen de la Faculté,
J.P. KERNEIS

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie
M. SCHMITT